

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Efecto del sistema cannabinoide endógeno
sobre la función de barrera intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ignacio Marín Jiménez

Directores

**Luis Alberto Menchén Viso
Juan Carlos Leza Cerro**

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

EFFECTO DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO SOBRE LA FUNCIÓN DE BARRERA INTESTINAL

Tesis doctoral:

IGNACIO MARÍN JIMÉNEZ

Directores de Tesis:

LUIS ALBERTO MENCHÉN VISO

JUAN CARLOS LEZA CERRO

2017

Para Inma, Nacho y Clara

Para mis padres

Agradecimientos:

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Luis Menchén, amigo, compañero, maestro y codirector de esta Tesis. Sin tu ayuda, paciencia y consejos nunca hubiera podido realizar este trabajo. Es una suerte poder compartir mi día a día contigo.

Al Profesor Juan Carlos Leza, codirector de esta Tesis, quien ha tenido la amabilidad de permitirme trabajar en su laboratorio. Muchas gracias por todo JC.

A Silvia Zoppi y David Martín, investigadores en el laboratorio de Farmacología del Profesor Leza y que tanto han colaborado en la realización de los experimentos que se describen aquí.

A los Dres. Enrique Cos y Venancio González Lara, del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Gregorio Marañón, quienes confiaron en mí para trabajar en su Servicio. Siempre agradeceré la oportunidad que me dieron.

Al Profesor Amado Salvador Peña, amigo, gran médico y científico con el que nunca dejaré de aprender.

Al Profesor Rafael Bañares, Jefe del Servicio de Aparato Digestivo, por sus consejos y constante ánimo para que se llevara a buen puerto este trabajo.

A José Madrigal, Javier Caso y Borja García-Bueno, miembros del laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina por su ayuda y apoyo constante durante todos estos años.

A los Dres. Luis Alou y María Luisa Gómez Lus, del Departamento de Medicina, Área Microbiología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense

de Madrid por su colaboración en la realización de los cultivos microbiológicos de los experimentos de esta Tesis.

Al Dr. Jorge Manzanares (Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante), quien ha cedido ratones *knock out* para su utilización en los experimentos de esta Tesis.

A Ana, Virginia, Jose, Ana López, Concha, Cari, Ascensión y tantos otros, amigos y compañeros de trabajo en la Sección de Gastroenterología y en el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Gregorio Marañón, que comparten su día a día conmigo, haciéndolo siempre agradable.

A tantos médicos residentes que se forman y trabajan con nosotros y nos sirven de inspiración y estímulo constante.

A Santiago López, quien me ha ayudado de forma excepcional en la búsqueda bibliográfica para poder desarrollar esta Tesis.

A Beatriz López Cauce y Javier Vaquero, del Hospital Gregorio Marañón, quienes colaboraron en experimentos sobre el sistema endocannabinoide.

A Juan Bañares futuro gran médico, que es ya un artista, por su ayuda en la preparación de algunos de los gráficos que aparecen en esta Tesis.

A mis padres, quienes me lo han dado todo. Gracias desde el principio hasta el final por ser como sois, un ejemplo que me sirve de inspiración cada día. Nunca os podré agradecer lo suficiente todo lo que habéis hecho por mí.

A mis hermanos Antonio y Juan, pilares de felicidad en mi infancia, hoy y siempre.

A Inma, primero compañera, luego amiga y ahora la persona más importante en mi vida. Gracias por estar a mi lado, y enseñarme cada día las cosas que de verdad importan.

A Nacho y Clara. Dos soles que brilláis con luz propia. No hay palabras para describir la alegría que compartimos.

Índice

Abreviaturas	IX
Resumen	XIII
Summary	XXI
Introducción	1
1. Función de barrera intestinal	3
1.1. Conceptos generales	3
1.2. Anatomía de la barrera intestinal	4
1.3. El epitelio intestinal en detalle	10
2. Disfunción de barrera intestinal en diferentes enfermedades	19
2.1. Conceptos generales	19
2.2. Enfermedad inflamatoria intestinal	23
2.3. Síndrome de intestino irritable	25
3. Efecto del estrés sobre la función intestinal	29
3.1. Conceptos generales sobre el estrés	29
3.2. Microbiota intestinal y homeostasis	32
3.3. Eje microbiota-intestino-cerebro	34
3.4. Neuroendocrinología intestinal del estrés	36
3.5. Estrés y disfunción intestinal	38
4. Sistema endocannabinoide	45
4.1. Introducción al sistema cannabinoide	45
4.2. Sistema endocannabinoide	46
4.3. Sistema endocannabinoide en el tubo digestivo	51
Hipótesis y objetivos	63
Antecedentes inmediatos	65
Hipótesis	65
Objetivos	67
Material y métodos	69
1. Animales	71
2. Grupos experimentales	72

3. Protocolo de estrés.....	72
4. Justificación del modelo	73
5. Identificación de proteínas por Western blot.....	74
6. Valoración de la permeabilidad cólica	75
7. Análisis de la translocación bacteriana	76
8. Determinación de IgA.....	77
9. Determinación de corticosterona plasmática.....	77
10. Reactivos químicos.....	77
11. Análisis estadístico	77
Resultados.....	81
1. Efecto del estrés acústico y por inmovilización sobre la expresión de CB1 y las enzimas de síntesis y degradación del SEC.....	83
2. Papel del CB1 en la permeabilidad paracelular cólica y la translocación bacteriana tras exposición al estrés	85
3. Papel del CB1 en la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon tras exposición a estrés.....	91
4. Papel del CB1 en la secreción cólica de IgA tras exposición al estrés	95
5. Efecto del EAI sobre los niveles de corticosterona plasmática en ratones WT y CB1 ^{-/-}	101
Discusión	103
Conclusiones.....	121
Bibliografía	125

Abreviaturas

2-AG: 2-araquidonil glicerol
 Å: ångström
 ACh: acetilcolina
 ACTH: hormona adenocorticotropa
 AEA: anandamida
 AINEs: antiinflamatorios no esteroideos
 AJ: uniones adherentes (*adherent junctions*)
 AJC: complejo apical de unión (*apical junction complex*)
 AMPc: adenilato monofosfato cíclico
 ANOVA: análisis de la varianza
 ATG16L1: *autophagy-related protein 16-1*
 ATP: adenosina trifosfato
 AU: unidades arbitrarias (*arbitrary units*)
 CAR: *Coxsackie and Adenovirus Receptor*
 CB: receptor cannabinoide
 CB1: receptor cannabinoide tipo 1
 CB1^{-/-}: ratones *knock-out* para CB1
 CB2: receptor cannabinoide tipo 2
 CB2^{-/-}: ratones *knock-out* para CB2
 CCK: colecistoquinina
 CCL28: quimioquina 28
 Ci: curio
 CI₅₀: concentración inhibitoria máxima 50
 CLMP: *CAR Like Membrane Protein*
 COX2: ciclooxigenasa 2
 CRF: factor liberador de corticotropina
 CTX: *cortical thymocyte maker in Xenopus*
 CU: colitis ulcerosa
 Δ⁹-THC: Δ⁹-tetrahidrocannabinol

DE: desviación estándar
DAGL: diacilglicerol lipasa
DHEA: docosahehexaenoiletanolamida
DTEA: docosatetraenoiletanolamida
EAI: estrés acústico y por inmovilización
EC: enfermedad de Crohn
EDTA: ácido etildiamoniotetracético
EHNA: esteatohepatitis no alcohólica
EII: enfermedad inflamatoria intestinal
EIA: enzimoimmunoassay
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMIC: eje microbiota-intestino-cerebro
EPEA: eicosapentaenoiletanolamida
FAAH: amido hidrolasa de ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*)
FLP-C: fosfolipasa-C
GABA: ácido γ -aminobutírico
GALT: *gut associated lymphoid tissue*; tejido linfático intestinal
GLM: ganglios linfáticos mesentéricos
HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal
IFN- γ : interferón gamma
Ig: inmunoglobulina
IgA: inmunoglobulina A
IL: interleucina
ip: intraperitoneal
IRGM: *immunity-related GTPase family M (protein)*
JAM: *junctional adhesion molecule*
 K_i : constante de inhibición
LEA: linoleoiletanolamida
LPS: lipopolisacárido
mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina
MAGK: *membrane associated guanylate kinase*
MAGL: monoacilglicerol lipasa
MAL: *myelin and lymphocyte protein*

MAPK: proteínas kinasas activadas por mitógenos

MARVEL: *MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*

MBP: *major basic protein* (proteína básica mayor)

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

MET: metirapona

MUPP-1: *multi-PDZ domain protein 1*

NADA: N-araquidonoildopamina

NF-κB: factor nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

NOD2/CARD15: *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2/caspase recruitment domain-containing protein 15*

NOGO-B: *neurite outgrowth inhibitor-B*

NOS2: sintasa de óxido nítrico

NPV: núcleo paraventricular del hipotálamo

NS: no significativo

OLDA: N-oleoildopamina

PAF: factor activador de plaquetas

PAR: receptor activado por proteasas

PDZ: PSD95-DlgA-ZO1

PG: prostaglandina

PLD-NAPE: fosfolipasa D de NAPE

PKA: proteína kinasa A

PPAR-γ : receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas

RNA_m: RNA mensajero

Rplg: receptor de inmunoglobulinas poliméricas

SAG: 1,esteatoril, 2-araquidonil-sn-glicerol

SAMP1: *senescence accelerated mouse prone 1*

SEC: sistema endocannabinoide

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SII: síndrome de intestino irritable

SII-A: síndrome de intestino irritable alternante

SII-D: síndrome de intestino irritable con predominio de diarrea

SII-E: síndrome de intestino irritable con predominio de estreñimiento

SNC: sistema nervioso central

SNE: sistema nervioso entérico

SNP: sistema nervioso parasimpático

SNS: sistema nervioso simpático

SP: sustancia P

TAMPs: *TJ-associated MARVEL-domain containing proteins*

TGI: tracto gastrointestinal

Th1: linfocitos T colaboradores (helper) tipo 1

TJ: uniones estrechas apicales (*tight junctions*)

TLR: *toll-like receptor*

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNBS: ácido trinitrobenzenosulfónico

TRH: hormona estimuladora de TSH / thyrotropin-releasing hormone

TRPV 1: receptor transitorio vallinoide tipo 1

Ucn: urocortinas

UFC: unidades formadoras de colonias

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VIP: péptido intestinal vasoactivo

WT: wild type

ZO: *zonula occludens*

Resumen

Introducción

Aparte de su función digestiva, el tracto gastrointestinal (TGI) representa (junto con la piel y el aparato respiratorio) un punto crucial de interacción directa entre nuestro organismo y el medio ambiente, ejerciendo una función de barrera selectiva y efectiva al mismo tiempo entre el sistema inmune de la mucosa gastrointestinal y la virtualmente infinidad de agentes microbianos y antígenos alimentarios en la superficie mucosa. Las células epiteliales intestinales constituyen el elemento fundamental de esta barrera y ejercen un papel preponderante tanto en la generación de tolerancia hacia los antígenos alimentarios y la flora comensal como en la activación y orquestación de unas respuestas inmunes innatas y adquiridas efectivas. Sin embargo, la barrera intestinal es una estructura dinámica constituida no sólo por componentes celulares sino por una gran variedad de elementos no celulares como son la mucina, los péptidos antimicrobianos, la inmunoglobulina A (IgA) secretora y las uniones apicales entre las células epiteliales adyacentes. Las uniones estrechas (*tight junctions*, *TJ*) son estructuras moleculares dinámicas que constituyen el punto de control limitante de la barrera epitelial intestinal paracelular.

Existen también cada vez más datos de estudios experimentales que demuestran el papel del estrés psicosocial en la inducción de cambios inflamatorios, tanto bioquímicos como histológicos, en la mucosa intestinal, lo cual es un elemento común en varias patologías. Múltiples estudios sugieren que la respuesta inflamatoria desencadenada por el estrés psicológico puede estar mediada, al menos en parte, por la inducción de disfunción en la barrera intestinal produciendo a su vez translocación bacteriana y un aumento de la captación de antígenos lumenales.

Los dos tipos de receptores cannabinoides (CB) descritos y clonados, CB1 y CB2, se expresan de forma diferente en el colon humano; mientras que el CB1 se expresa en las células epiteliales intestinales, el músculo liso, el plexo mientérico y las células plasmáticas de la *lamina propria*, el CB2 se expresa fundamentalmente en condiciones fisiológicas en las células

plasmáticas y los macrófagos aunque se ha descrito recientemente también en las neuronas del plexo mientérico y submucoso de roedores y muestras humanas.

Los efectos de la activación de los CB y el papel fisiológico de los endocannabinoides en el tracto gastrointestinal se han revisado de forma detallada; en resumen la activación de CB1 actúa fundamentalmente vía el eje intestino-cerebro para reducir la motilidad gastrointestinal, la diarrea el dolor o la hiperalgesia, la relajación transitoria del esfínter esofágico inferior, la emesis y la secreción ácida, al mismo tiempo que promueve la ingesta. La activación de CB2 actúa sobre todo a través de las células del sistema inmunológico para reducir la inflamación a través de un efecto inhibitorio de la liberación de interleucina-8 (IL-8) en las células epiteliales cólicas. Sin embargo, el papel del sistema endocannabinoide (SEC), y en particular de CB1, en la función de barrera intestinal y la homeostasis mucosa es todavía muy poco conocido. Algunos datos sugieren una actividad antiinflamatoria endógena de CB1 debido a que los ratones con ausencia de expresión de CB1 muestran colitis más graves que los ratones no defectivos. En el mismo sentido, se ha demostrado que la administración de agonistas CB o la disminución de la degradación de diferentes endocannabinoides puede ejercer un papel protector en varios modelos animales de colitis experimental.

Hipótesis y objetivos

Nuestra hipótesis de partida es que CB1 modula la función de barrera intestinal en ratones expuestos a estrés acústico y por inmovilización (EAI).

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Valorar el efecto de la exposición a estrés sobre la expresión intestinal de CB1 y las enzimas de síntesis y degradación del SEC intestinal

2. Estudiar el papel del CB1 en la permeabilidad epitelial paracelular cólica y la translocación bacteriana tras exposición a estrés
3. Determinar el papel del CB1 en la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon tras exposición a estrés
4. Evaluar el efecto del CB1 sobre la secreción cólica de IgA tras la exposición al estrés
5. Valorar el efecto del EAI sobre los niveles plasmáticos de corticosterona en ratones *wild type* (WT) y con ausencia de expresión de CB1 mediada genéticamente (CB1^{-/-}) y su influencia en la permeabilidad epitelial

Material y métodos

Para alcanzar nuestros objetivos empleamos un modelo de ratón CB1^{-/-} y una aproximación farmacológica con un antagonista de CB1 (rimonabant).

Los CB1^{-/-} y los ratones WT fueron expuestos a un modelo experimental de estrés ampliamente utilizado en estudios similares consistente en estrés acústico y por inmovilización (EAI) durante 2 h al día 4 días consecutivos.

Se evaluó la expresión proteica de las formas inducibles de la óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa (NOS2 y COX2), la producción de IgA, la permeabilidad a ⁵¹Cr-EDTA y la translocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo.

Para analizar si los efectos observados en la función de barrera intestinal pudieran ser atribuibles a los elevados niveles de corticosterona en los ratones con ausencia de expresión de CB1, se inyectó en un grupo de ratones CB1^{-/-} un bloqueante de la síntesis de glucocorticoides (metirapona) antes de cada sesión de estrés.

Resultados

El EAI no produjo cambios en la expresión de CB1 pero sí incrementó la expresión de enzimas de degradación del SEC sin producir cambios en las enzimas de síntesis de dicho sistema.

El EAI indujo una mayor expresión de las enzimas proinflamatorias NOS2 y COX2 en la mucosa cólica de los ratones CB1^{-/-} y los tratados con el rimonabant en comparación con los controles WT.

Estos cambios se relacionaron con un mayor grado de disfunción de la barrera epitelial cólica en los ratones CB1^{-/-} medida mediante 1) una menor secreción de IgA, 2) un aumento de la permeabilidad paracelular a ⁵¹Cr-EDTA, y 3) una mayor translocación bacteriana tanto en condiciones basales como tras exposición a EAI. El antagonismo farmacológico con rimonabant reprodujo el aumento de las enzimas proinflamatorias en el colon inducido por el estrés descrito en los ratones CB1^{-/-}.

El bloqueo de la síntesis de corticosterona no influyó en la permeabilidad intestinal observada en los ratones CB1^{-/-}.

Conclusiones

Las principales conclusiones de esta Tesis doctoral son:

1.- El estrés agudo y por inmovilización no aumenta la expresión de CB1 pero sí produce un incremento de la expresión de las enzimas de degradación del sistema endocannabinoide intestinal sin alterar la expresión de las enzimas de síntesis de dicho sistema.

2.- Los ratones que carecen mediante manipulación genética de la vía de señalización mediada por CB1 muestran un incremento de la permeabilidad

epitelial paracelular cólica y de la translocación bacteriana tras exposición al estrés que no está mediado por ocludina ni por NOGO-B.

3.- La ausencia de señalización vía CB1 a través de un modelo genético y farmacológico produce un aumento de la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon tras exposición al estrés.

4.- El bloqueo genético y farmacológico del CB1 disminuye la producción cólica de IgA no mediado por CCL28.

5.- La inhibición farmacológica de la síntesis de glucocorticoides no afectó a la permeabilidad cólica en ratones estresados CB1^{-/-}, lo que sugiere que el aumento de la permeabilidad cólica observada se debe a otros factores distintos de la elevación de los niveles de corticosterona.

Summary

Introduction

Besides its essential digestive function, the gastrointestinal tract represents, apart from the skin and the respiratory tract, the main interplay between the host and the environment, exerting an effective but also selective barrier function between the gastrointestinal mucosal immune system and the virtually infinite microbial and alimentary antigens on the mucosal surface. Intestinal epithelial cells constitute the main element of this barrier and exert pivotal roles both in the generation of tolerance toward alimentary antigens and commensal microbiota, and in the activation and orchestration of effective innate and adaptive immune responses. However, intestinal barrier is a dynamic structure constituted not only by cellular components but also by an array of noncellular elements such as mucin, antimicrobial peptides, secretory immunoglobulin A (IgA) as well as apical tight junctions between adjacent epithelial cells. Tight junctions are dynamic molecular structures that constitute the rate-limiting seal of the intestinal epithelial barrier paracellular pathway.

Growing evidence from experimental studies supports the ability of psychosocial stress to induce biochemical and histological inflammatory changes in the intestinal mucosa, a fact that is described in the pathogenesis of many diseases. A wide variety of results suggest that such intestinal inflammatory response triggered by psychological and physical stress could be mediated, at least in part, by the induction of intestinal barrier dysfunction resulting in bacterial translocation and enhanced uptake of luminal antigens.

The two types of cannabinoid receptors (CB) that have been discovered and cloned, CB1 and CB2, are differentially expressed in the human colon; whereas CB1 is expressed in intestinal epithelial cells, smooth muscle, myenteric plexus, and *lamina propria* plasma cells, CB2 is mainly expressed under physiological circumstances in plasma cells and macrophages but has also been recently found in myenteric and submucosal neurons of rodent and human bowel samples.

The effects of CB activation and the physiological roles for

endocannabinoids in the gastrointestinal tract have been extensively reviewed; briefly, CB1 activation acts mostly via brain-gut axis to reduce gastrointestinal motility, diarrhea, pain or hyperalgesia, transient lower esophageal sphincter relaxations, emesis, and gastric acid secretion, as well as to promote eating; CB2 activation acts mostly via immune cells to reduce inflammation through, at least, an inhibitory effect on interleukin-8 release in human colonic epithelial cells.

However, the role of the endocannabinoid system, and in particular CB1, in intestinal barrier function and mucosal homeostasis is still largely unknown; although the exact mechanisms are poorly understood, some findings support the notion of an endogenous anti-inflammatory activity of CB1 because mice lacking CB1 show enhanced colitis compared with their wild-type (WT) littermates. Consistent with this observation, administration of CB agonists or targeting endocannabinoid degradation has been shown to protect against various forms of experimental colitis in animal models.

Hypothesis and objectives

Our hypothesis is that CB1 modulates intestinal barrier function in mice exposed to immobilization and acoustic stress.

To demonstrate our hypothesis we outlined these aims:

1. To evaluate the effect of stress exposure on the expression of CB1 and the synthesis and degradation enzymes of the endocannabinoid system in the bowel
2. To study the effect of CB1 on intestinal colonic paracellular permeability and bacterial translocation after stress exposure
3. To study the effect of CB1 on colonic proinflammatory enzymes expression after stress exposure
4. To evaluate the effect of CB1 on colonic secretion of IgA after stress exposure

5. To investigate the effect of immobilization and acoustic stress on plasmatic corticosterone levels in WT and CB1^{-/-} mice and its influence on intestinal permeability

Material and methods

For our purpose we took advantage of the use of genetically modified mice lacking CB1, as well as pharmacological manipulation of CB1 with an antagonist (rimonabant).

CB1 knock out mice (CB1^{-/-}) and their wild-type (WT) counterparts were exposed to immobilization and acoustic stress for 2 h per day during 4 consecutive days. Colonic protein expression of the inducible forms of the nitric oxide synthase and cyclooxygenase (NOS2 and COX2), IgA production, permeability to ⁵¹Cr-EDTA and bacterial translocation to mesenteric lymph nodes, liver and spleen were evaluated.

To analyze whether the observed effects on intestinal barrier function may be attributable to elevated corticosterone levels in the mice lacking CB1 receptor, a complete set of CB1^{-/-} mice were intraperitoneally injected, before each stress session, with the glucocorticoid synthesis blocker metyrapone.

Results

Exposure to immobilization and acoustic stress did not induce changes in the expression of CB1; it also did not change the expression of synthesis enzymes of the endocannabinoid system, but increased the expression of the degradation enzymes.

Immobilization and acoustic stress exposure induced greater expression of proinflammatory enzymes NOS2 and COX2 in colonic mucosa of CB1^{-/-} mice and those treated with rimonabant when compared with WT animals.

These changes were related with a greater degree of colonic barrier

dysfunction in CB1^{-/-} animals determined by: 1) a significantly lower IgA secretion, 2) higher paracellular permeability to ⁵¹Cr-EDTA, and 3) higher bacterial translocation, both under basal conditions and after immobilization and acoustic stress exposure. Pharmacological antagonism with rimonabant reproduced stress-induced increase of proinflammatory enzymes in the colon described in CB1^{-/-} mice. Blocking of corticosterone synthesis did not influence the intestinal permeability observed in CB1^{-/-} mice.

Conclusions

Considering the above results the following conclusions were drawn:

1. Immobilization and acoustic stress did not change the expression of CB1; no changes in endocannabinoid synthesis enzymes were observed although there was an increase of the degradation enzymes expression.
2. Mice lacking CB1 signaling through a genetic model showed an increase in colonic paracellular permeability and bacterial translocation after stress exposure, non-mediated by occludin nor NOGO-B.
3. Mice lacking CB1 signalling through a genetic and pharmacological model showed an increase in colonic proinflammatory enzyme expression after stress exposure.
4. Mice lacking CB1 signalling through a genetic and pharmacological model showed a decrease in colonic production of IgA non-mediated by CCL28.
5. Pharmacological block of corticosterone synthesis with metyrapone did not influence the intestinal permeability observed in CB1^{-/-} mice.

Introducción

1. Función de barrera intestinal

1.1. Conceptos generales

Los organismos multicelulares complejos interaccionan con el ambiente externo en múltiples sitios incluyendo la mucosa de la vía aérea, la cavidad oral, el tracto digestivo y genitourinario y la piel¹.

El tracto gastrointestinal (TGI) es una de las regiones anatómicas más expuestas a la carga antigénica externa debido a su función y a que tiene una gran superficie de contacto con el medio externo, que ocupa unos 32 metros cuadrados^{2, 3}.

Además de la función nutricional, el TGI realiza una función defensiva para evitar que agentes potencialmente perjudiciales (como, por ejemplo, patógenos, antígenos y agentes proinflamatorios) alcancen el medio interno desde la luz intestinal al tiempo que permite el paso de forma selectiva de sustancias que favorecen el desarrollo del sistema inmune y la inmunotolerancia¹. De hecho, la mucosa intestinal está particularmente adaptada a la colonización por bacterias comensales que juegan un papel en el proceso digestivo y que influyen de forma decisiva en el desarrollo y la función el sistema inmune intestinal⁴. Ambas funciones (la nutricional y la defensiva) actúan de forma coordinada basándose en la particular anatomía de la mucosa intestinal y, más específicamente, en la llamada “función de barrera intestinal” donde varios mecanismos inmunológicos y no-inmunológicos confluyen para asegurar su buen funcionamiento⁵.

Cuando se producen cambios en los mecanismos defensivos de esta función de barrera y se favorece el paso de sustancias lumbinales normalmente excluidas al compartimento corporal interno, se pueden producir respuestas inmunológicas exageradas que a su vez pueden ampliar la disfunción de la barrera y perpetuar el proceso inflamatorio⁶.

El término de “barrera intestinal” viene derivado de otro previo de “barrera mucosa” adoptado por Cummings en 2004⁷. La “barrera mucosa” describe la estructura compleja que separa el medio interno del medio

ambiente. La “barrera intestinal” ha sido definida recientemente⁸ como una entidad funcional que separa la luz intestinal del medio interno del huésped y que consta de elementos mecánicos (moco, capa epitelial con sus uniones intercelulares), elementos humorales (defensinas y otros péptidos antimicrobianos, IgA), elementos inmunológicos (linfocitos, células dendríticas) y elementos musculares y neurológicos. La “función de barrera intestinal” es la capacidad de esta barrera de restringir el libre intercambio de agua, iones y macromoléculas entre la luz intestinal y los tejidos subyacentes⁹.

1.2. Anatomía de la barrera intestinal

La barrera intestinal consta de componentes extracelulares y celulares, de acuerdo a su naturaleza y su localización anatómica⁶ (**figura 1**).

1.1.1. Componentes extracelulares

El primer nivel de protección del TGI se debe al peristaltismo, producido por los músculos del intestino y que permite evacuar el contenido intestinal y reducir el tiempo de retención, acortando con ello la presencia de potenciales sustancias tóxicas o patógenas en la luz intestinal¹⁰.

El segundo nivel de protección aparece en la luz intestinal, donde los microorganismos y antígenos se degradan de forma inespecífica por el pH y las secreciones salivales, gástricas, pancreáticas y biliares. Las enzimas digestivas (proteasas, lipasas, amilasas y nucleasas) ejercen su efecto destructivo sobre los microorganismos mediante la descomposición de su pared celular, permitiendo destruir y eliminar una gran proporción de los organismos que ingerimos⁶.

El epitelio intestinal está recubierto de un gel hidratado compuesto de mucina, agua y glicocáliz de unas 100 micras de grosor, que es fundamentalmente secretado por las células caliciformes y que tiene propiedades hidrofóbicas y surfactantes que evitan que las bacterias se adhieran al epitelio intestinal^{6, 11}. La importancia del efecto protector de la mucina viene demostrada por el hallazgo de que en un modelo de ratón defectivo para Muc2, que es la mucina más frecuentemente expresada en el

epitelio intestinal de ratones, ratas y humanos, los animales desarrollan inflamación cólica y se facilita la perpetuación de colitis inducida experimentalmente¹².

En el colon, al igual que en el estómago, existen dos capas mucosas (interna y externa), mientras que en el intestino delgado existe una sola capa¹³. Por encima de la capa mucosa interna se encuentra una capa mucosa externa que contribuye a la retención de moco rico en péptidos antibacterianos y evita la posible adhesión epitelial y la subsiguiente invasión transepitelial de microorganismos^{6, 14}.

La capa mucosa externa contiene también IgA secretora (sintetizada por las células plasmáticas de la *lamina propria*), y péptidos antimicrobianos secretados por las células de Paneth¹⁵. La IgA es el tipo de anticuerpo más frecuente en las secreciones mucosas humanas y representa una primera línea de defensa frente a los patógenos ingeridos o inhalados. Los péptidos antimicrobianos incluyen: fosfolípidos, mucinas y péptidos activos contra bacterias, hongos, levaduras, virus y células tumorales tales como péptidos trébol (*trefoil factor family peptides*), catelicidinas, ribonucleasas y defensinas⁶. La acción antimicrobiana de estos péptidos se produce mediante la lisis bacteriana inducida por la formación de poros en la membrana aunque algunos de ellos (como por ejemplo las criptidinas 2 y 3) pueden inducir la secreción de agua en la luz intestinal consiguiendo con ello eliminar las bacterias de la superficie del epitelio intestinal^{6, 16}. Las defensinas tienen una actividad altamente selectiva frente a las bacterias, ejerciendo un efecto bactericida contra las bacterias patógenas que está ausente o es mínimo frente a las bacterias comensales; de esta manera se constituyen en un regulador importante de la composición de la microbiota intestinal¹⁷.

La capa mucosa interna, también llamada glicocálix, de mayor densidad que la externa y que permanece adherida al epitelio, sirve para facilitar la absorción de nutrientes al tiempo que mantiene una hidratación adecuada del epitelio y protege a la capa epitelial de la tensión de desgarro luminal y de la acción de las enzimas digestivas^{6, 13}. El glicocálix participa también en la renovación y diferenciación del epitelio intestinal y en el mantenimiento de la

tolerancia oral mediante una vía de señalización tolerogénica que limita la inmunogenicidad frente a antígenos en el intestino¹³.

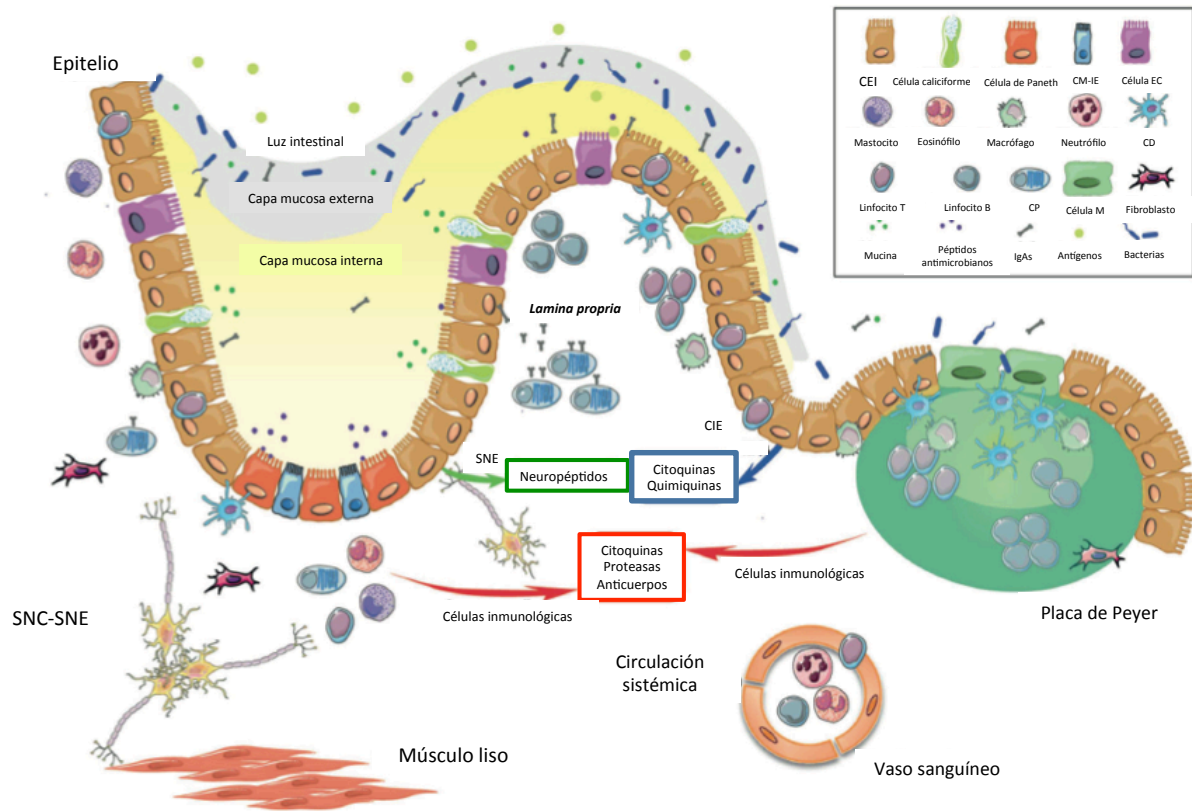


Figura 1.- Anatomía de la barrera intestinal y componentes de la misma.

La mucosa intestinal consta de una capa de células epiteliales columnares polarizadas y una región subepitelial que contiene la *lamina propia*, el sistema nervioso entérico, el tejido conectivo y las capas musculares. Existen diferentes tipos de células en el epitelio intestinal: enterocitos, células caliciformes, células de Paneth, células enterocromafines y células madre intestinales. Por fuera de la barrera epitelial se sitúan las capas mucosas externa (que contiene la microbiota, IgA secretora, mucina y péptidos antimicrobianos) e interna (glicocálix). En la *lamina propia* encontramos un tejido linfoide difuso con macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos de la *lamina propia* y neutrófilos, y un tejido linfoide organizado en las placas de Peyer, que contiene células M, células dendríticas y linfocitos (SNC: sistema nervioso central; SNE: sistema nervioso entérico; CEI: célula intestinal intraepitelial; CMIE: Célula madre intraepitelial; Célula EC: célula enterocromafín; IgAs: IgA secretora) (adaptado de Salvo-Romero y cols.⁶)

1.1.2. Componentes celulares

1.1.2.1. Microbiota

El primer componente celular de la barrera intestinal lo constituye la flora intestinal o microbiota, situada en la parte más externa de la barrera y que ejerce su función crucial influyendo en el metabolismo, proliferación y mantenimiento de la barrera epitelial. Asimismo la flora comensal restringe la colonización por gérmenes patógenos compitiendo por los nutrientes y el nicho ecológico, modificando el pH, liberando sustancias con efecto antimicrobiano que permiten la comunicación entre especies y optimizando la cantidad de organismos beneficiosos¹⁸. Otras funciones fundamentales de la microbiota intestinal son la adquisición de nutrientes, la regulación energética, y la participación activa en procesos como la respuesta inflamatoria, la reparación epitelial y la angiogénesis¹⁹.

1.1.2.2. El epitelio intestinal

El epitelio intestinal está formado por una capa única de células epiteliales especializadas y polarizadas que se renueva completamente cada 3-5 días. Las células madre pluripotenciales del epitelio intestinal residen en las criptas de Lieberkühn y generan células que migran a la parte superior de las vellosidades donde se produce la diferenciación final²⁰. La mayor parte de la monocapa epitelial intestinal está constituida por enterocitos (un 80% aproximadamente), pero existen otros tipos celulares que ejercen acciones específicas en el epitelio. Las células caliciformes están especializadas en la secreción de moco, las células de Paneth en la secreción de defensinas, las células enterocromafines en la secreción de hormonas y neuropéptidos y las células M -en la superficie de las placas de Peyer- se encargan de la captación de antígenos de la luz intestinal²¹.

Los enterocitos son elementos clave en el epitelio intestinal, ya que ejercen acciones digestivas, metabólicas, y de mantenimiento de la integridad física de la barrera. También tienen acción inmunológica porque expresan receptores implicados en la respuesta inmune innata, actúan como células presentadoras de antígenos y liberan varias citoquinas y quimioquinas (como la linfopoyetina estromal tímica, o la IL-25) implicadas en el reclutamiento y activación leucocitaria y en la regulación de la respuesta inmune local²². En el apartado 1.3 se explica en detalle la estructura y funcionamiento del epitelio intestinal.

1.1.2.3. Región subepitelial

La región subepitelial incluye la *lamina propria*, que alberga células del sistema inmune, el sistema nervioso entérico y tejido conectivo⁶. Las células inmunes del TGI conforman el llamado tejido linfoide asociado al intestino (*gut associated lymphoid tissue*, GALT), que tiene dos compartimentos²³:

- GALT organizado: que induce la respuesta inmune
- GALT difuso: que efectúa la respuesta inmune

El GALT organizado está formado por folículos linfoides, placas de Peyer y ganglios mesentéricos²⁴. Las placas de Peyer del epitelio intestinal contienen células M²⁵, especializadas en el rastreo de la luz intestinal y en el mantenimiento de la función de barrera intestinal. Estas células facilitan la captación de antígenos y microorganismos lumbinales y su presentación a las células inmunes subyacentes para conseguir una respuesta inmune eficiente tanto mucosa como sistémica²⁶.

Por el contrario el GALT difuso está compuesto por dos poblaciones leucocitarias situadas a ambos lados de la membrana basal: los linfocitos intraepiteliales y los linfocitos de la *lamina propria*⁶. Los linfocitos intraepiteliales son fundamentalmente células T CD8+ que se sitúan entre las células epiteliales sobre la membrana basal y cuya función principal es rastrear y responder a bacterias y otros antígenos lumbinales. Por su parte, los linfocitos de la *lamina propria* son una población heterogénea con un 50% de células

plasmáticas y un 30% de células T, que se pueden subdividir en función del tipo de citoquinas que secreten²⁷.

El tejido conectivo está situado adyacente al epitelio y alberga células inmunológicas, neuronas, vasos sanguíneos y fibroblastos. Los fibroblastos mantienen la matriz extracelular, secretando colágeno y metaloproteinasas, y juegan un papel crucial en la proliferación del epitelio intestinal²⁸ regulándolo a través del factor de crecimiento hepatocitario²⁹.

El sistema nervioso entérico (SNE) es una parte fundamental del sistema nervioso y constituye una red entrelazada de neuronas y células de la glía agrupadas en los ganglios de dos grandes plexos: el plexo mientérico o de Auerbach y el plexo submucoso o de Meissner⁶. El SNE y el sistema nervioso central (SNC) coordinan las funciones digestivas y el mantenimiento de la homeostasis intestinal mediante la liberación de neurotransmisores e, indirectamente, a través de interacciones neuroinmunes. El SNE está en contacto íntimo con las células del epitelio intestinal y las células neuroendocrinas, modulando la respuesta inflamatoria y colaborando con el sistema inmune en la respuesta a patógenos⁶. El SNE está constituido por neuronas sensitivas, interneuronas y motoneuronas, que controlan el peristaltismo, cambios en el flujo sanguíneo local y la secreción de agua y electrolitos³⁰. También forman parte del SNE células de la glía entérica que conforman una gran red a través de las diferentes capas del TGI y actúan como intermediarias en el proceso de la neurotransmisión e información entérica^{6, 31}.

El papel del SNE en la función de barrera es crucial debido a su control sobre la acción motora y secretora, y sobre la microcirculación y la acción inmunológica intestinal. Esta comunicación tiene lugar a través de mediadores químicos como neuropéptidos, neurohormonas, neurotransmisores, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y otras moléculas reguladoras³².

1.3. El epitelio intestinal en detalle

Las células epiteliales conforman una monocapa continua polarizada en la que las membranas celulares individuales están interconectadas y conectadas a su vez a la membrana basal mediante complejos proteicos que otorgan al epitelio la integridad estructural necesaria para ejercer sus funciones específicas. El epitelio intestinal se renueva de forma dinámica en el transcurso de menos de una semana³³. Hay que destacar que las propiedades de barrera no sólo se mantienen sino que se modifican según las células madre progenitoras de las criptas proliferan, se diferencian y anidan en la superficie luminal del intestino²¹ (**figura 2**). Las células madre del epitelio intestinal generan múltiples linajes celulares incluyendo enterocitos (80% de las células), células caliciformes productoras de moco, células enteroendocrinas y células de Paneth.

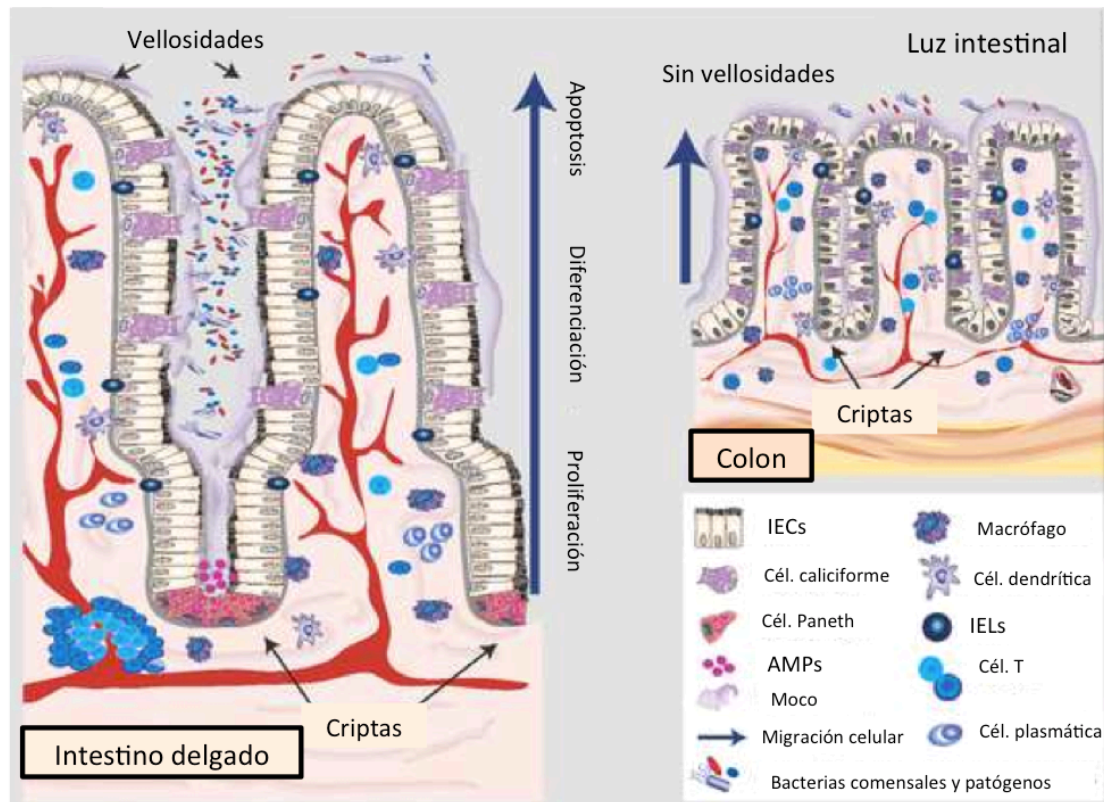


Figura 2.- Estructura de la mucosa intestinal.

En el intestino delgado la mucosa se pliega para formar estructuras luminales llamadas vellosidades y criptas, mientras que el colon carece de vellosidades, teniendo sólo criptas. El epitelio se está regenerando constantemente con células madre progenitoras de la base de las criptas que proliferan, se diferencian y migran a lo largo del eje cripta-luz seguido de una muerte celular regulada en la superficie luminal. (IEC: célula intestinal epitelial; IEL: linfocito intraepitelial; AMPs: péptidos antimicrobianos; adaptado de Luissint y cols³³).

La función de barrera epitelial está mediada por una serie de uniones intercelulares que incluyen las uniones estrechas apicales (*tight junctions*; TJ), las uniones adherentes subyacentes (*adherent junctions*; AJ) y los desmosomas. Dada su proximidad tanto estructural como funcional, las TJ y las AJ se denominan de forma colectiva como el complejo apical de unión (*apical junction complex*; AJC). La estructura esencial de las uniones intercelulares

consiste en proteínas transmembrana que se asocian con proteínas de placa citoplasmáticas ancladas al citoesqueleto (**figura 3**).

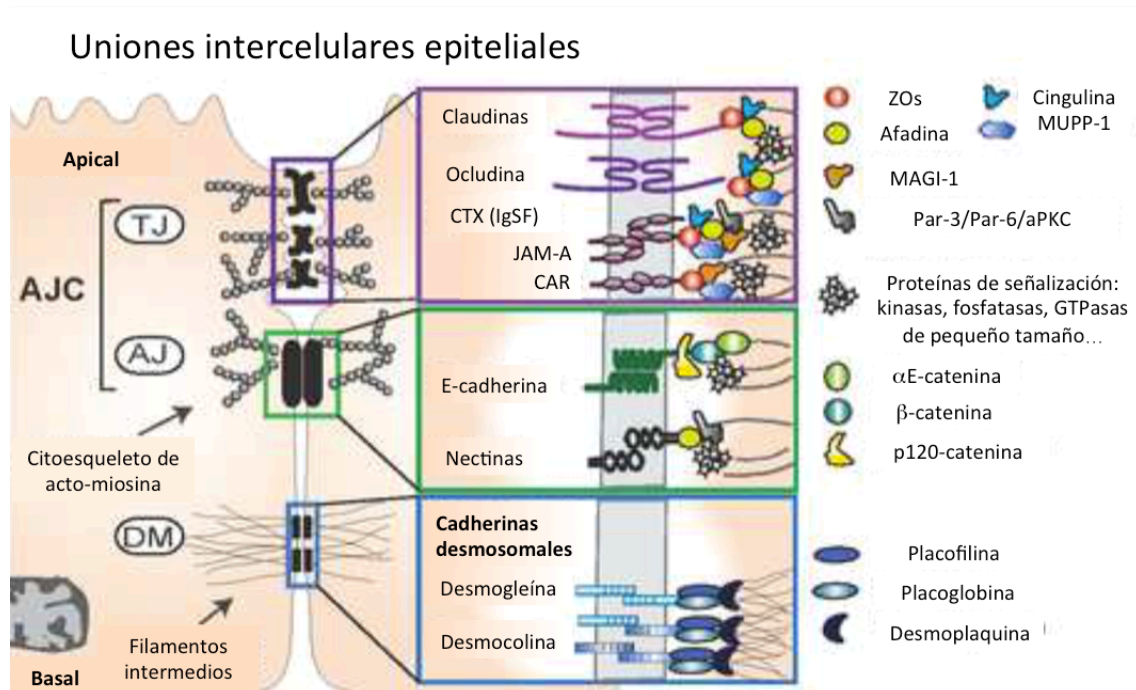


Figura 3.- Complejos de unión intercelular del epitelio intestinal.

Los complejos de unión intercelular intestinal consisten en los AJC (que constan de las TJ y las AJ) y los desmosomas (DM). Las TJ y AJ se asocian con un citoesqueleto subyacente de actina-miosina mientras que los DM se relacionan con los filamentos intermedios. Las TJ, AJ y los complejos DM están formados por proteínas transmembrana que se asocian con un ensamblaje de TJ y proteínas de señalización, tal y como se muestra: CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*); JAM (*Junctional Adhesion Molecule*); MAGI-1 (*membrane associated guanylate kinase*); MUPP-1 (*multi-PDZ domain protein 1*); aPKC (*atypical protein kinase C*); Par-3/Par-6 (*partitioning defective 3/-6*); ZO (*Zonula occludens*) (modificado de Luissint y cols³⁴).

1.3.1 Uniones estrechas apicales (*tight junctions*; TJ)

Las TJ se sitúan entre la membrana apical y basolateral. Aparte de controlar el movimiento de fluidos y solutos en el espacio paracelular, las TJ contribuyen a establecer la polaridad celular³⁵.

Existen tres grandes familias de proteínas transmembrana que conforman la estructura fundamental de la TJ: las claudinas, las *TJ-associated MARVEL-domain containing proteins* (TAMPs) y los miembros del *cortical thymocyte maker in Xenopus* (CTX).

La permeabilidad paracelular epitelial viene condicionada por una vía determinada por poros (*pore pathway*) de alta capacidad, selectiva para carga y tamaño, que es permeable para iones y pequeños solutos con radio inferior a 4 Å; y por una vía determinada por aperturas transitorias (*leak pathway*) de baja capacidad, independiente de carga y tamaño que está implicada en el tráfico paracelular de macromoléculas³⁶. Ambas vías están mediadas por constituyentes moleculares específicos de las TJ.

1.3.1.1 Claudinas

Las claudinas regulan la función de las TJ mediante una vía determinada por poros gracias a la formación de canales paracelulares anión-selectivos o catión-selectivos. Las claudinas se expresan de forma diferente a lo largo del TGI y a lo largo del eje cripta-luz; esta distribución topográfica en la expresión de claudinas se altera durante los procesos de inflamación intestinal y se ha propuesto como un mecanismo de disrupción de la barrera intestinal en los procesos de inflamación intestinal³³.

1.3.1.2 TAMPs

Los miembros de esta familia de proteínas tetraspaninas (con 4 dominios transmembrana) incluyen a la ocludina, MARVELD2 (también llamada tricelulina, que aparece en los contactos tricelulares) y MARVELD3³⁷. La ocludina fue la primera de las proteínas transmembrana de las TJ que se describió, aunque actualmente existe controversia sobre su papel en el control de barrera epitelial. Esto es debido a que se ha demostrado que se pueden conformar unas TJ bien desarrolladas en células epiteliales deficientes para ocludina³⁸ y a que ratones deficientes en ocludina son viables, mostrando una función de barrera epitelial intestinal normal³⁹. La ocludina participa en el ensamblaje y desensamblaje de las TJ, estando su localización en la membrana regulada por la fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina. Las ocludinas altamente fosforiladas aparecen en las TJ mientras que las ocludinas defosforiladas aparecen en el citoplasma, por lo que cambios en el grado de fosforilación de la ocludina pueden comprometer la estabilidad de las TJ e incrementar la permeabilidad paracelular⁴⁰.

1.3.1.3 Proteínas de la familia CTX

La familia de moléculas de adhesión CTX incluye al receptor F11 (JAM-A), a JAM-B y a JAM-C. Son una subfamilia de inmunoglobulinas expresadas por las células epiteliales y endoteliales, al igual que por los leucocitos y las plaquetas.

JAM-A tiene un papel muy importante en la regulación de la función de barrera epitelial. Los ratones *knock-out* para JAM-A y las células epiteliales humanas deficientes en JAM-A tienen defectos de barrera que se asocian a un aumento de la expresión de “claudinas porosas” (*leaky claudins*) (claudinas 10 y 15) y alteraciones del citoesqueleto de actina alrededor de la unión intercelular⁴¹. Los ratones deficientes en JAM-A no presentan síntomas de patología intestinal debido a mecanismos compensadores mucosos y a respuestas inmunes adaptativas protectoras que son secundarias a una barrera epitelial intestinal

“porosa”⁴². Sin embargo estos animales sí presentan una mayor susceptibilidad a la colitis inducida, lo cual apoya el papel que juega JAM-A en la regulación de la función de barrera epitelial intestinal y en la homeostasis mucosa⁴³.

El receptor de Coxsackie y Adenovirus (CAR) es otro miembro de la familia CTX estrechamente relacionado con las proteínas JAM. El CAR se localiza en las TJ donde interacciona con otras proteínas como la *Zonula occludens-1* (ZO-1) y MUPP-1 (*multi-PDZ domain protein*) para regular la función de barrera epitelial⁴⁴. La pérdida de CAR no afecta a la formación del complejo proteico de las TJ en ratones deficientes de CAR⁴⁵, pero sí controla la estabilidad de las AJ mediante la regulación de la E-cadherina en la superficie celular mediada por la fosforilación de CAR por una proteína quinasa C⁴⁶.

1.3.1.4 La placa de las TJ y las proteínas de señalización

Se han identificado más de 50 proteínas en las TJ y la lista sigue aumentando. Algunos ejemplos de grupos de proteínas que conforman esta placa son: proteínas con dominios que contienen PSD95-DlgA-ZO1 (PDZ), proteínas de unión a actina, complejos de señalización (tales como kinasas, fosfatasa, y pequeñas GTPasas) asociadas a proteínas transmembrana de las TJ y que contribuyen a la formación de la placa de TJ mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras, moléculas de señalización, y reguladores transcripcionales⁴⁷.

Entre las proteínas con dominios PDZ cabe destacar a las proteínas de la familia de guanilato ciclasas asociadas a membrana como la ZO-1, ZO-2 y ZO-3 que interaccionan directamente con la porción de unión a PDZ de las claudinas, JAM-A y CAR⁴⁸. Por el contrario la ocludina se une a los dominios guanilato ciclasas y ácidos de la ZO-1. Asimismo las proteínas ZO sirven de enlace entre las proteínas transmembrana de las TJ y el citoesqueleto de actomiosina controlando así la función de las TJ⁴⁹. Otras proteínas con dominios PDZ que participan en las TJ, aparte de las ZO, son las proteínas de anclaje como la afadina, MUPP-1, proteínas de complejos de polaridad como Par3 o Par6, y proteínas de señalización incluyendo kinasas, fosfatasa y pequeñas GTPasas.

1.3.2 Uniones adherentes (*adherent junctions*, AJ)

El ensamblaje y mantenimiento de la barrera epitelial intestinal no se limita a las TJ sino que depende del efecto aditivo y la interacción entre TJ, AJ y desmosomas⁵⁰. La AJ es un complejo de unión filogenéticamente antiguo que inicia y mantiene los contactos epiteliales célula-célula (**figura 3**). La proteína transmembrana clave en la AJ es la E-cadherina, que media adhesiones homotípicas celulares calcio-dependientes. En la cara citoplasmática de la AJ la E-cadherina se asocia con la p-120, la β -catenina y la α -E-catenina formando un complejo que se ancla a los filamentos corticales de actina⁵¹. Varios estudios han demostrado que la pérdida específica en el epitelio intestinal de E-cadherina o p-120 producen una disrupción de la arquitectura epitelial y la aparición de inflamación mucosa espontánea^{52, 53}.

Un mecanismo común de las AJ y TJ que regula el ensamblaje y la estabilidad de las mismas implica sus interacciones con el citoesqueleto cortical de actina. Las placas citosólicas de AJ y TJ contienen ciertas proteínas de unión a actina (α -E-catenina, familia ZO, afadina y cingulina) que anclan los complejos de unión a los haces de F-actina subyacentes⁵⁴. Distintos estudios que han empleado tanto un abordaje farmacológico como genético para alterar los filamentos de actina han demostrado un papel muy relevante del citoesqueleto de actina en el control de la función de AJ y TJ^{54, 55}.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha descrito el papel de una proteína del retículo endoplásmico (reticulon-4B/NOGO-B) que interacciona con E-cadherina y α -catenina interviniendo en la función de barrera intestinal, estando su expresión reducida tanto en muestras humanas de pacientes con enfermedad de Crohn como en un modelos experimental de colitis en ratones IL-10^{-/-} ⁵⁶.

1.3.3 Desmosomas

Los desmosomas proporcionan fuerza mecánica al epitelio. Las cadherinas transmembrana de los desmosomas incluyen la desmogleína y desmocolina. De los 7 tipos de cadherinas desmosomales descritos (4 desmogleínas y 3 desmocolinas), en las células epiteliales intestinales humanas se expresan 2 desmogleínas y 2 desmocolinas, que se asocian con proteínas de la placa, incluyendo la placofilina y placoglobina que a su vez se unen a la desmoplaquina que ancla el complejo proteico desmosomal a los filamentos intermedios⁵⁷. Aunque se conoce muy poco sobre el papel de las proteínas desmosomales en el control de la función de barrera epitelial intestinal, es fácil suponer que deben jugar un papel muy relevante ya que el epitelio intestinal está sometido a un gran estrés mecánico (de estiramiento y compresión) originado por los movimientos intestinales peristálticos³³.

2. Disfunción de barrera intestinal en diferentes enfermedades

2.1. Conceptos generales

Existen diferentes enfermedades tanto intestinales como extraintestinales que se han asociado con alteraciones de la barrera intestinal y un aumento de la permeabilidad de la misma⁸. De entre todas las descritas (**tablas 1 y 2**) cabe destacar a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el síndrome de intestino irritable (SII), la enfermedad celíaca, la enfermedad del paciente crítico (síndrome de disfunción multiorgánica), la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la obesidad, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y la cirrosis.

Enfermedad	Datos en humanos sobre permeabilidad intestinal	¿Modelos animales que lo apoyen?	Implicaciones pronósticas del aumento de permeabilidad	Papel de la microbiota	¿Mejora el tratamiento de la enfermedad la permeabilidad intestinal?
EII (EC y CU)	Correlación positiva con la actividad de la enfermedad; presentan la alteración en algunos familiares sanos de 1º grado (EC)	Sí ⁵⁸⁻⁶¹	Aumento del riesgo de recaída en algunos pacientes con EC ^{62, 63}	La infección por <i>Trichuris suis</i> y el trasplante fecal han conseguido resultados alentadores ^{64, 65} . Los ratones <i>germ-free</i> no desarrollan la enfermedad en la mayoría de los modelos experimentales ⁶¹	Sí (tanto en pacientes como en modelos experimentales) ^{58, 66, 67}
Enfermedad injerto contra huésped	Correlación positiva de toxicidad GI precondicionamiento con actividad de la enfermedad ⁶⁸	Sí ⁶⁹	Desconocidas	Los antibióticos reducen la incidencia de la enfermedad en pacientes y en modelos animales ^{70, 71}	Sí (en modelos experimentales) ⁶⁹
Diabetes tipo I	Aumentada en pacientes prediabéticos y diabéticos ⁷²	Sí ⁷³	Desconocidas	Cambios en el microbioma modifican la incidencia de enfermedad en modelos experimentales ^{74, 75}	Desconocido
HIV/SIDA	Aumentada en la enteropatía por VIH ⁷⁶ ; correlación positiva con el estadio de la enfermedad ⁷⁷	Sí ⁷⁸	Desconocidas	Elevación de LPS en suero de pacientes. La translocación bacteriana se ha postulado como causa de activación inmune ⁷⁸	Sí (en pacientes) ⁷⁹
Síndrome de disfunción multiorgánica/grandes quemados	Se correlaciona con la gravedad de la enfermedad ⁸⁰	Sí ⁸¹⁻⁸⁴	Desconocidas	En grandes quemados se produce disbiosis del microbioma y sobrecrecimiento de bacterias Gram- ⁸⁴	Desconocido
Síndrome de intestino irritable (SII)	Aumenta en SII de predominio diarrea, postinfeccioso y no-postinfeccioso ^{85, 86}	No	Desconocidas	Desconocido	Desconocido
Enfermedad celíaca	Correlación positiva con la actividad de la enfermedad ⁸⁷ ; aumentada en pacientes y familiares sanos ⁸⁸	Sí ^{89, 90}	Desconocidas	Desconocido	Sí ⁸⁷

Tabla 1.- Relación entre la función de barrera intestinal y determinadas enfermedades (modificada de Odenwald y cols.⁹¹)

Enfermedad	Datos en humanos sobre permeabilidad intestinal	¿Modelos animales que lo apoyen?	Implicaciones pronósticas del aumento de permeabilidad	Papel de la microbiota	¿Mejora el tratamiento de la enfermedad la permeabilidad intestinal?
Autismo	Aumentada en pacientes y familiares; se correlaciona con intolerancias alimentarias ⁹²	No	Desconocidas	Desconocido	Desconocido
Ecema	Aumentada en un subgrupo de pacientes; posible correlación con la actividad de la enfermedad ^{93, 94}	No	Desconocidas	Desconocido	Desconocido
Psoriasis	No concluyentes	No	Desconocidas	Desconocido	Desconocido
Pancreatitis aguda	Correlación positiva con la actividad de la enfermedad ⁹⁵	Sí ^{96, 97}	Desconocidas	Desconocido	Sí (en modelos experimentales) ^{96, 98}
Enfermedad de Parkinson	Aumentada en un subgrupo de pacientes ⁹⁹⁻¹⁰¹	Sí ¹⁰²	Desconocidas	Reducción de la familia bacteriana <i>Prevotellaceae</i> en pacientes vs. controles	Desconocido
Fibromialgia	Aumentada en un subgrupo de pacientes; no se ha estudiado la correlación con la actividad de la enfermedad ¹⁰³	No	Desconocidas	Desconocido (no hay modelos experimentales, pero el grado de sobrecrecimiento bacteriano se correlaciona con la intensidad del dolor ¹⁰⁴	Desconocido
Depresión	Asociación controvertida ¹⁰⁵	Sí ¹⁰⁶	Desconocidas	Disminución de <i>Faecalibacterium</i> en pacientes y correlación negativa con gravedad de depresión ¹⁰⁷	Desconocido
Asma	Aumentada en pacientes asmáticos; no hay correlación con la actividad de la enfermedad ¹⁰⁸	No	Desconocidas	Se hipotetiza sobre su posible papel protector ¹⁰⁹	No
Esclerosis múltiple	Aumentada en un subgrupo de pacientes; normal en remisión ¹¹⁰	No	Desconocidas	Reducción de la enfermedad inducida experimentalmente en ratones <i>germ-free</i> ¹¹¹	Desconocido
Enfermedades reumatológicas (artritis y espondilitis anquilosante)	Aumentada en pacientes ¹¹² ; el consumo de AINEs es un factor de confusión ¹¹³	NO	Desconocidas	Los síntomas tienen correlación con el estado <i>germ-free</i> en ratas ¹¹⁴ ; la flora intestinal empeora la enfermedad en modelos murinos ¹¹⁵	Desconocido

Esteatohepatitis no-alcohólica (EHNA)	Correlación positiva con la actividad de la enfermedad ^{116, 117}	No	Desconocidas	Correlación en humanos ¹¹⁶ . Fuerte asociación en ratones ^{118, 119}	Desconocido
Cirrosis alcohólica	Aumentada en un subgrupo de pacientes; no se ha estudiado la posible correlación con la actividad ¹²⁰	No	Desconocidas	Se postula que es la fuente de LPS que lleva al daño hepático y la inflamación ¹²¹	Desconocido

Tabla 2.- Relación entre la función de barrera intestinal y determinadas enfermedades (continuación de la tabla 1; modificada de Odenwald y cols.⁹¹)

La toma de conciencia de la importancia de la barrera intestinal hace plantearse qué factores pueden afectar a la misma⁸. Existen una serie de posibles causas (**tabla 3**) de alteración de la barrera intestinal que incluye nutrientes que pueden actuar interfiriendo con las TJ o inhibiendo histonas deacetilasas, infecciones virales, toxinas, o hipoperfusión intestinal. Asimismo se ha descrito que el lugar de residencia (urbano/rural), la realización de ejercicio físico, y la toma de ciertos fármacos (por ejemplo: antibióticos o antiinflamatorios no esteroideos -AINEs-) parecen ejercer un papel muy relevante sobre la función de barrera intestinal.

Factores nutricionales	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración de las TJ • Inhibidores de histonas deacetilasas
Infecciones y toxinas	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones virales intestinales • Toxinas ambientales • Intoxicación alimentaria
“Teoría del exceso de higiene”	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora en las condiciones de conservación de los alimentos • Incremento global de las medidas de limpieza
“Hipótesis del estilo de vida”	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración de la función y la biodiversidad de la microbiota intestinal
Factores endógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Hipoperfusión intestinal • Inflamación crónica/autoinmunidad

Tabla 3.- Posibles causas de alteración de la barrera intestinal

A continuación se describen dos grupos de enfermedades (la EII y el SII) donde se han estudiado en profundidad la influencia de la alteración de la barrera intestinal sobre la etiopatogenia de las mismas.

2.2. Enfermedad inflamatoria intestinal

La disfunción de la barrera intestinal es un elemento clave en la fisiopatología de la EII, tanto de la enfermedad de Crohn (EC) como de la colitis ulcerosa (CU)¹²²⁻¹²⁴. En el año 1997 se describió que un aumento de la permeabilidad intestinal precede a las manifestaciones clínicas de la EC, pero es insuficiente para causar la enfermedad, lo que va a favor de la existencia de otros cofactores implicados¹²⁵.

El hecho de que la alteración en la permeabilidad intestinal es un proceso precoz en el desarrollo de la EC lo demuestra el hecho de que hay un aumento de la permeabilidad paracelular incluso en pacientes con EII quiescente y que dicho aumento de permeabilidad se correlaciona con la actividad clínica de la enfermedad aún en ausencia de datos endoscópicos de actividad¹²⁶. De hecho, el estudio *ex vivo* en biopsias de colon de pacientes con EC¹²⁷ usando cámaras de Ussing demuestra un incremento espacial uniforme en la conductividad transepitelial independiente de la presencia de mínimas erosiones mucosas. Este hallazgo se ha relacionado con un descenso de la expresión de las proteínas de las TJ.

Por otro lado varios estudios han relacionado la aparición de brotes de la enfermedad con un aumento de la permeabilidad intestinal^{163, 128}.

Finalmente, modelos animales de EC (ratones *knock-out* para IL-10 y ratones SAMP1/YitFc) confirman un incremento de la permeabilidad que puede detectarse antes de la aparición de la inflamación mucosa¹²⁹.

Además, hay genes implicados en la homeostasis de la barrera intestinal que se han asociado a presentar susceptibilidad para la EII¹³⁰ lo que sugiere la existencia de predisposición genética, apoyada aún más por el dato de que hasta un 40% de los familiares de primer grado de los pacientes con EC

presentan una permeabilidad intestinal alterada¹³¹⁻¹³⁵, con una asociación significativa con EC con agregación familiar y variantes de NOD2/CARD15^{136, 137}. Este gen, implicado en el reconocimiento bacteriano, modula tanto la respuesta inmune innata como adquirida y es el gen con mayor peso para el desarrollo de EC¹²⁶. Otros estudios no han encontrado una correlación entre la permeabilidad y los polimorfismos genéticos^{134, 135, 138} aunque hay que destacar que la mayor parte de ellos incluyen casos esporádicos de EC. No hay que olvidar que otros factores, como la edad o el tabaquismo, pueden influir de manera notable sobre la permeabilidad intestinal en los familiares de los pacientes afectados por EII, incluso de forma más relevante que el genotipo¹³⁸.

Independientemente de que sea mediada genéticamente o causada por factores ambientales, la alteración de la permeabilidad produce una disrupción del balance fisiológico entre la barrera mucosa y el contenido luminal¹³⁹ que no puede ser adecuadamente contrarrestado por la inmunidad innata en los pacientes con EII, los cuales responden con una activación inmune aberrante¹⁴⁰. Se han descrito varios defectos en el reconocimiento y procesamiento bacteriano en los pacientes con EC portadores de ciertos polimorfismos, fundamentalmente en los receptores de reconocimiento de patrón como NOD2/CARD15^{141, 142}, y en genes implicados en la autofagia como ATG16L1 e IRGM^{143, 144}. En la mucosa intestinal existe una regulación bidireccional entre la expresión de NOD2/CARD15 y la microbiota intestinal: los ratones deficientes en NOD2/CARD15 presentan una mayor facilidad para ser colonizados por bacterias patógenas y, de forma recíproca, la suplementación con bacterias comensales a ratones en condiciones de esterilidad (*germ-free*) induce la expresión de NOD2/CARD15¹⁴⁵.

En este sentido, es interesante resaltar que un estudio reciente¹⁴⁶ ha demostrado que la autofagia inducida por el ayuno produce un aumento de la función de barrera intestinal (y una reducción de la permeabilidad paracelular) mediada por el bloqueo de la degradación lisosomal de la claudina-2.

Por último, la microbiota está también alterada en los pacientes con EII, tanto en su composición relativa como en su diversidad. Esto puede representar una consecuencia de la inflamación mucosa crónica, pero la influencia del genotipo en la modulación del microbioma no puede ser pasada

por alto en la EC¹⁴⁷ ya que el genotipo NOD2/CARD15 se ha demostrado que influye en la composición de la microbiota intestinal en humanos¹⁴⁸. Esta disbiosis puede agravar la disfunción de la permeabilidad por la pérdida de relaciones simbióticas entre la microbiota y la integridad de la barrera mucosa¹⁴⁹.

Los primeros datos publicados sobre los efectos beneficiosos de los probióticos en la EII fueron con *E.coli* Nissle 1917, con beneficio en el mantenimiento de la remisión de los pacientes con CU^{150, 151}. El siguiente hallazgo importante fue que una combinación probiótica (VSL#3) mejora y previene la reservoritis en los pacientes con CU^{152, 153}. Desde entonces, múltiples estudios han demostrado los efectos beneficiosos de los probióticos en pacientes adultos y pediátricos con CU, aunque los datos en EC son escasos. El mecanismo último que explique el efecto beneficioso de los probióticos en la EII no está totalmente aclarado aunque parece implicar un efecto anti-inflamatorio directo (por ejemplo mediante la modulación de los TLR) o por su acción indirecta mejorando la función de barrera intestinal^{154, 155}.

2.3. Síndrome de intestino irritable

La disfunción de barrera intestinal parece ejercer un papel patogénico no sólo en la EII sino en el SII¹²². Existen datos que describen que el aumento de permeabilidad descrito en el SII se debe a un bajo grado de inflamación crónica, asociado a hipersensibilidad visceral y a dolor¹⁵⁶. En el SII con predominio de diarrea (SII-D) los estudios de microscopía electrónica han mostrado una condensación del citoesqueleto y un aumento de los espacios intercelulares entre las células epiteliales, lo que proporciona una base morfológica para un aumento de la permeabilidad en el SII. Estos cambios estructurales se correlacionan tanto con la activación de los mastocitos como con los síntomas, incluyendo la diarrea y la gravedad del dolor¹⁵⁷. Estos datos corroboran observaciones previas en experimentos en los que se empleaban cámaras de Ussing que mostraron un aumento de la permeabilidad paracelular en muestras cólicas de pacientes con SII¹⁵⁸. La causa última de estos cambios

morfológicos y funcionales en la permeabilidad epitelial intestinal no está aclarada.

Los defectos de la barrera mucosa producen un aumento de flujo de sustancias antigénicas que estimulan el sistema inmune mucoso. Varios estudios demuestran una activación inmune de bajo grado y la liberación de moléculas inflamatorias en el SII, lo cual mantiene el incremento de la permeabilidad intestinal¹⁵⁹. Es posible que la pérdida de ciertas proteínas de las TJ (como la ocludina) sea el resultado de un aumento de la degradación mediada por proteosomas, a su vez producida por la inflamación de bajo grado¹⁶⁰. Los factores que se han relacionado como inductores del bajo grado de inflamación y la alteración de la permeabilidad en el SII son la dieta, la microbiota y los ácidos biliares. Aparte de estos factores exógenos existen elementos endógenos como la histamina producida por los mastocitos, las proteasas, y los eicosanoides que pueden aumentar la permeabilidad intestinal tanto directamente como por la estimulación de neuronas del SNE^{158, 161, 162}.

La serotonina producida por las células enterocromafines del intestino es otro desencadenante endógeno de dolor, inflamación y aumento de la permeabilidad en pacientes con SII¹⁶³. De hecho, el LX1031, un inhibidor oral de la triptófano hidroxilasa, la enzima clave de la síntesis mucosa de serotonina se ha empleado con éxito para el tratamiento de pacientes con SII¹⁶⁴.

Existen, por tanto, pruebas sólidas que relacionan un aumento de la permeabilidad intestinal con la activación del sistema inmune y síntomas como la diarrea o el dolor en pacientes con SII. Estos datos han permitido identificar nuevos biomarcadores de la enfermedad y dianas terapéuticas en el SII. Aparte de los estabilizadores de mastocitos¹⁶⁵ y los antagonistas de la serotonina¹⁶⁴ también hay abordajes dietéticos y con probióticos que han alcanzado cierto grado de beneficio para los pacientes con SII¹⁶⁶. El valor de los probióticos para el tratamiento del SII se ha debatido durante mucho tiempo, sin embargo, recientes revisiones sistemáticas y meta-análisis han confirmado que ciertos probióticos pueden ser efectivos en poblaciones seleccionadas de pacientes con SII^{167, 168}. Los síntomas que más se benefician del tratamiento con probióticos son el meteorismo y la distensión abdominal. Cabe destacar,

además, que en ciertos ensayos clínicos se ha demostrado que los efectos beneficiosos se correlacionan con una mejoría en la permeabilidad intestinal¹⁶⁹.

En el recién publicado documento de consenso Roma IV sobre las enfermedades funcionales digestivas¹⁷⁰ existe un capítulo específico de investigación básica¹⁷¹ en el que se destaca el papel crucial de la función de barrera intestinal en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y cómo las alteraciones de la misma pueden provocar la aparición o la perpetuación de las enfermedades funcionales intestinales.

3. Efecto del estrés sobre la función intestinal

3.1. Conceptos generales sobre el estrés

El Diccionario de la lengua española de la Real Academia (edición 23^a, 2014¹⁷²) define el estrés como la tensión provocada por situaciones agobiantes que originan reacciones psicosomáticas o trastornos psicológicos a veces graves.

En la actualidad existen multitud de definiciones de “estrés”; en la mayoría de ellas se entiende el estrés como una situación en la que la homeostasis (que es el equilibrio dinámico en el que los componentes del organismo están en constante cambio para mantenerlo en condiciones estables dentro de ciertos márgenes) está comprometida.

Ya en la medicina griega clásica se describe que la enfermedad tiene dos componentes: la alteración anatomofisiológica (*pathos*) y el sufrimiento o fatiga por restablecer la salud (*ponos*).

Este concepto fue retomado en el año 1865 por Claude Bernard cuando publicó su libro “*Introduction à la médecine expérimentale*”; en dicho texto describió sus primeras observaciones sobre el papel del hígado en la secreción de glucosa a partir de los depósitos de glucógeno y cómo sus estudios de la regulación de la temperatura llevaron al descubrimiento de la regulación del flujo vascular sanguíneo por el sistema nervioso simpático¹⁷³. Partiendo de observaciones tan específicas, desarrolló el concepto de que la capacidad de un organismo de mantener un medio ambiente fluido constante que bañe las células del cuerpo – el “*milieu intérieur*” – es esencial para la vida, independientemente del medio externo.

Posteriormente, en el año 1929 Cannon acuñó el término “homeostasis” para definir el mantenimiento en un rango aceptable de diversas variables como la glucemia, la presión de oxígeno o la temperatura central¹⁷⁴. Los mecanismos para mantener la estabilidad requieren sensores para reconocer las discrepancias entre lo detectado y los valores aceptables y requiere también de efectores para reducir estas discrepancias si existieran. Cannon extendió este concepto para incluir las amenazas psicológicas a la

homeostasis, describiendo a principios del siglo XX por primera vez los cambios agudos en la secreción de las glándulas adrenales asociados a lo que denominó las respuestas de “lucha o huye” (*fight or flight*).

El término “estrés” fue definido por primera vez en el ámbito biomédico por Hans Selye como “*el estado fisiopatológico asociado con los cambios fisiológicos específicos inducidos por diversos estímulos físicos y fisiológicos*”¹⁷⁵.

El concepto de estrés es multidimensional, y está constituido por varios elementos: un estímulo inicial (estresante), el procesamiento del estímulo por parte del sistema nervioso y la posterior respuesta adaptativa o respuesta al estrés¹⁷⁶. El estímulo estresante se define como un cambio que aparece en el medio, y es detectable por un organismo, que es potencialmente dañino para éste y provoca tanto respuestas agudas como crónicas adaptativas. La respuesta que se produce al estrés es un proceso multifactorial en el que participan diversos factores fisiológicos, comportamentales, cognitivos y/o emocionales¹⁷⁷. Ejemplos de los cambios fisiológicos que aparecen como respuesta a un estímulo estresante son: aumento de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea, redistribución del flujo sanguíneo del compartimento esplácnico hacia el cerebro y los músculos, y el aumento del tono muscular, la frecuencia respiratoria y la motilidad intestinal. Son estos los cambios que preparan al organismo de cara a la posible respuesta de “lucha o huye” descrita por Cannon, arriba mencionada.

Selye propuso tres estados en el proceso de afrontamiento con un factor estresante – denominado como “Síndrome general de adaptación” – que consisten en la fase inicial o de alarma (correspondiente a la de “lucha o huye” descrita por Cannon), un estado de adaptación asociado con la resistencia al factor estresante y, finalmente, un estado de agotamiento final o muerte del organismo.

Siguiendo con los conceptos propuestos por Selye, no siempre debe considerarse al estrés como algo nocivo para el organismo¹⁷⁸. Selye acuñó el término de “eustrés” para definir aquel estrés que no es perjudicial y que puede ser beneficioso para el organismo; y “distrés” que es aquel estrés que es potencialmente perjudicial o es percibido como desagradable por el organismo.

El “distrés” es una forma de estrés que tiene cuatro características específicas (**figura 4**): conciencia del individuo, aversión del mismo, produce la aparición de signos en el individuo que otros individuos pueden interpretar como secundarios a que ha existido un estímulo estresante, y, por último, activa las glándulas adrenales aumentando la liberación de catecolaminas de la médula adrenal y glucocorticoides de la corteza adrenal, hecho que puede aparecer también con el “eustrés”¹⁷⁹.

El “eustrés” y el “distrés” en los humanos han ofrecido ventajas de supervivencia a lo largo del proceso evolutivo, pero en el mundo actual pueden producir importantes patologías tanto psicológicas como somáticas.

Otro concepto que está tomando cada vez mayor relevancia en el mundo de la psicología del estrés es el de “resiliencia”¹⁸⁰ que es la capacidad de adaptación de un ser vivo frente a un agente perturbador o un estado o situación adversos. Los organismos pueden protegerse y recuperarse de los daños producidos por el “distrés” e incluso aprender a anticiparse al mismo y preparar ajustes del propio organismo que mitiguen de alguna forma la futura exposición al factor estresante¹⁷⁹.

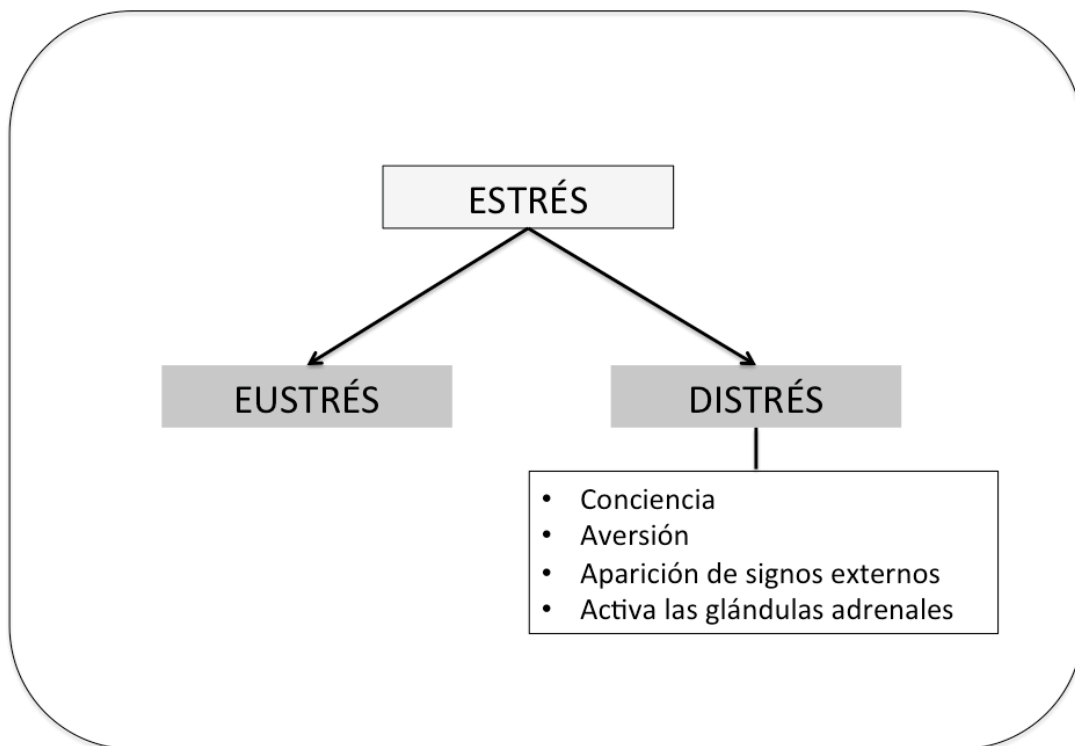


Figura 4.- Estrés: eustrés y distrés

3.2. Microbiota intestinal y homeostasis

Cada ser humano posee una combinación única de microorganismos que colonizan su intestino, fundamentalmente bacterias, pero también arqueas, virus y protozoos, en un número aproximado de 10^{14} , sobrepasando en un factor de 10 al número de células eucariotas de nuestro cuerpo¹⁸¹.

El tracto intestinal humano es esencialmente estéril al nacer, pero inmediatamente desde el mismo parto se coloniza y evoluciona durante los primeros años de vida hacia una microbiota altamente específica del individuo – el equivalente a su huella dactilar – que posteriormente se mantiene estable a lo largo de su vida¹⁸².

De los más de 50 *phyla* descritos en la literatura, sólo unos pocos se encuentran en el TGI humano, en el que destacan dos *phyla* en particular (Firmicutes y Bacteroidetes), junto con miembros de los *phyla* Actinobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Fusobacteria y Cyanobacteria¹⁸³. Estos *phyla* autóctonos colonizan el tracto gastrointestinal y están presentes en la mayoría de los individuos.

Recientemente se ha propuesto el concepto de “enterotipo”; de acuerdo con estos, los humanos se pueden dividir en subtipos que serían *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus*¹⁸⁴. Sin embargo, esta categorización ha sido cuestionada y se ha propuesto el término de “enterogradientes” para describir las comunidades bacterianas con prevalencia de *Bacteroides* o *Prevotella*¹⁸⁵.

Los microorganismos en el intestino humano sufren una presión selectiva del huésped al igual que de competidores microbianos, y una vez que el ecosistema alcanza la homeostasis algunas especies abundarán mientras otras escasearán¹⁸⁶.

Aunque la microbiota intestinal difiera de forma significativa entre los individuos tanto en tipo de especies como en estructura organizativa, sigue siendo, a grandes rasgos, funcionalmente equivalente y necesaria para el adecuado desarrollo del huésped. Los mamíferos han coevolucionado para existir con su microbiota intestinal en una relación simbiótica en la que los microorganismos participan en la conversión de los carbohidratos no

absorbibles (fibra dietética) a ácidos grasos de cadena corta, en el metabolismo de los ácidos biliares, y proporcionan una barrera contra las bacterias patógenas, modulando por tanto la inmunidad innata y adquirida¹⁸⁶. Por su parte, el huésped proporciona un nicho único, rico en nutrientes y con una temperatura estable¹⁸³.

Estudios con animales nacidos y estabulados *germ-free* han destacado la importancia de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la homeostasis. Los animales *germ-free* tienen anomalías fisiológicas y metabólicas comparados con los animales convencionales, al igual que desarrollan un sistema inmune desequilibrado¹⁸⁷. Además, los animales *germ-free* presentan una motilidad gastrointestinal anómala¹⁸¹, un incremento de la expresión de genes que codifican para transportadores a lo largo del intestino¹⁸⁸ y una alteración en la percepción del dolor inflamatorio¹⁸⁹. Por otro lado los animales *germ-free* tienen una capacidad alterada para extraer energía de la dieta¹⁹⁰ y están protegidos frente a la obesidad inducida por la dieta¹⁹¹. Por lo tanto, no debe sorprender que las alteraciones en la composición de una microbiota intestinal normal (disbiosis) se asocien con una gran variedad de enfermedades gastrointestinales tales como la EII, el SII y la enfermedad celíaca¹⁹²⁻¹⁹⁴. Lo que aún queda por demostrarse es que una determinada “firma o impronta microbiológica” para disbiosis esté asociada a alguna enfermedad en concreto.

Sin embargo, hay suficientes datos que apoyan el concepto de que los cambios en la microbiota pueden aparecer en la edad adulta como consecuencia de una enfermedad, unos hábitos dietéticos mantenidos, el uso de antibióticos o de medicaciones específicas. Estos cambios pueden ser a corto o largo plazo, dependiendo de la duración del desencadenante que los produjo o de las características particulares del huésped. Por el contrario, los factores que influyen sobre el normal proceso de colonización durante las fases iniciales de la vida, como el estrés psicológico, pueden ejercer efectos a largo plazo en la composición de la microbiota que impacten en la susceptibilidad a las enfermedades.

3.3. Eje microbiota-intestino-cerebro

Es bien conocido que el intestino y el cerebro están interconectados. El concepto del eje cerebro-intestinal surgió del campo de la endocrinología gastrointestinal y el descubrimiento de la regulación hormonal de la digestión¹⁹⁵. Desde entonces ha evolucionado para incluir el mantenimiento de la homeostasis de diversos sistemas, incluyendo la función gastrointestinal, el apetito y el mantenimiento del peso¹⁹⁶. Por lo tanto es lógico incluir a la microbiota como un importante modulador de este sistema, surgiendo de ahí el concepto de eje microbiota-intestino-cerebro (EMIC)¹⁹⁷.

Los beneficios demostrados por los laxantes y los antibióticos para el tratamiento de la encefalopatía hepática son uno de los primeros hallazgos que relacionaron la microbiota intestinal con la función cerebral¹⁹⁸. Más recientemente se ha descrito que una composición anómala de la microbiota intestinal se ha relacionado con el autismo¹⁹⁹ y que el tratamiento antibiótico de los pacientes con autismo de inicio tardío parece mejorar la evolución clínica de los mismos²⁰⁰. Por otro lado, una bacteria anaerobia Gram-negativa (*Bacteroides fragilis*) que habita el tracto digestivo inferior de la mayor parte de los mamíferos ha demostrado mejorar ciertos parámetros comportamentales en un modelo animal de autismo²⁰¹. Los mecanismos subyacentes pueden implicar la modulación de la composición de la microbiota intestinal y del perfil metabólico sérico²⁰². También se ha postulado que existe un trastorno en el metabolismo intestinal de los pacientes con trastorno depresivo mayor²⁰³.

Lo que es difícil de saber es si lo que acontece en primer lugar es una alteración cerebral o comportamental que va seguida de disfunción intestinal y disbiosis o si los acontecimientos aparecen en sentido inverso. Es muy posible que ambas situaciones coexistan en un circuito que se retroalimenta (**figura 5**) de forma mantenida y que el estímulo inicial pudiera surgir tanto de forma central como periférica¹⁸¹.

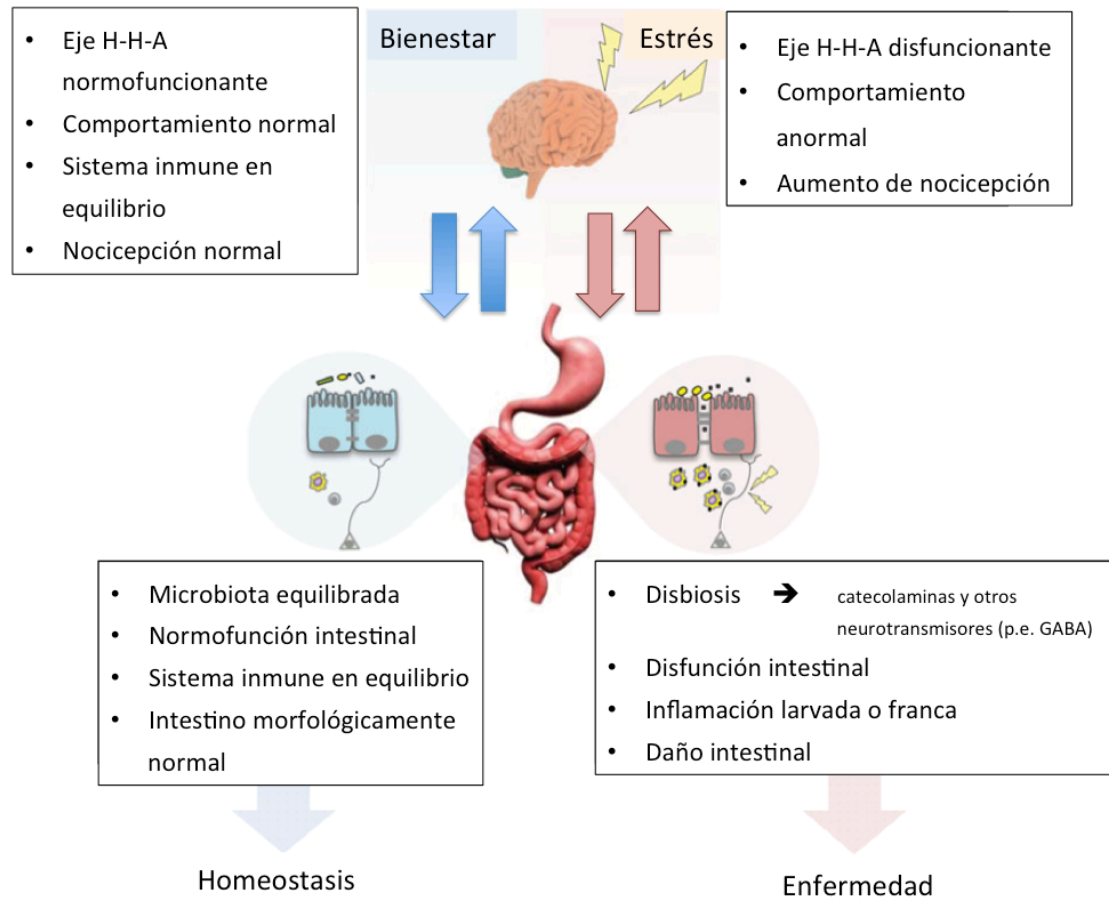


Figura 5.- El eje microbiota-intestino-cerebro (EIMC).

Durante el estrés se producen alteraciones a nivel del SNC que pueden producir alteraciones en la función secretora y neuromotora intestinal, así como en la inmunidad y la composición de la microbiota. La disbiosis resultante puede contribuir a la perpetuación de la disfunción y la inflamación. Algunos de estos efectos pueden ser mediados por interacciones directas huésped-agente microbiano a nivel del epitelio intestinal o por la producción de metabolitos bacterianos (catecolaminas, GABA). La secuencia de acontecimientos puede producirse en ambos sentidos (arriba abajo o viceversa), pero una vez iniciada es capaz de perpetuar o exacerbar respuestas inadaptadas que producen enfermedades (modificado de De Palma y cols. 2014¹⁸¹).

3.4. Neuroendocrinología intestinal del estrés

3.4.1 Sistema nervioso

Aparte de la innervación intrínseca mediada por el SNE que regula sus funciones esenciales (motilidad, secreción, transporte epitelial y flujo sanguíneo), el TGI recibe una profusa innervación desde el SNC a través de los nervios simpáticos y parasimpáticos que constituyen la base neurológica del EMIC²⁰⁴. El nervio vago es la principal vía de innervación del sistema parasimpático en el intestino (**figura 6**); la mayoría de las fibras nerviosas vagales son proyecciones aferentes de neuronas localizadas en el ganglio dorsal que a su vez envían axones al núcleo del tracto solitario localizado en el bulbo. Esas fibras responden a estímulos mecánicos en rango fisiológico, mediando sensaciones como la saciedad o la náusea, pero también pueden ejercer un papel importante en la modulación de la nocicepción.

Con respecto de la innervación simpática gastrointestinal, las vías aferentes ascienden a lo largo de la médula espinal hasta el tálamo y luego a la corteza transmitiendo información visceral. Las vías eferentes simpáticas originadas en la médula espinal alcanzan el tracto gastrointestinal inhibiendo tanto su motilidad como su función mediante la liberación de acetilcolina que inhibe a las neuronas intrínsecas.

La innervación central del tracto gastrointestinal no sólo regula su función motora y sensitiva, el EMIC también está involucrado en modulación de la permeabilidad intestinal y del sistema mucoso inmune, influyendo así en la respuesta inflamatoria intestinal²⁰⁵.

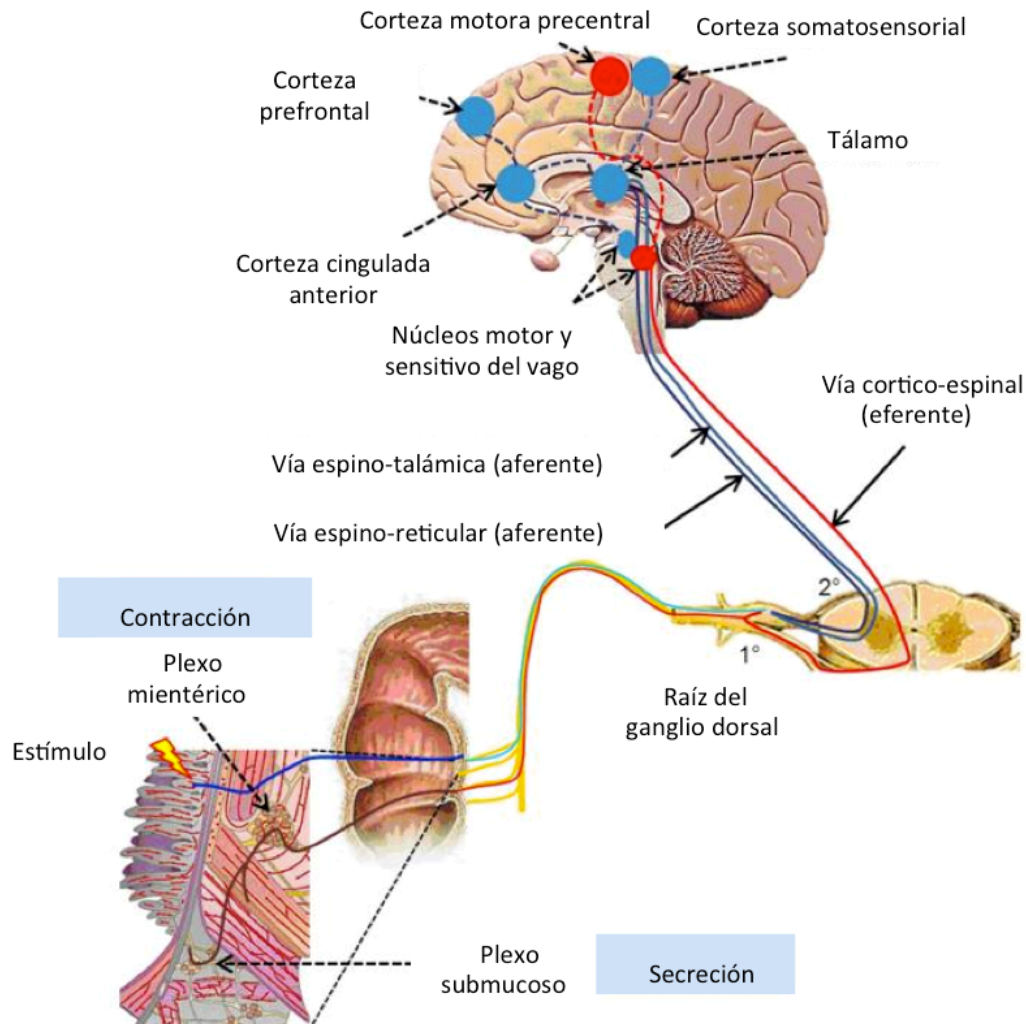


Figura 6.- Vías nerviosas en el eje cerebro-intestinal.

Cuando aparece el estímulo (rayo amarillo) la información aferente viaja por el nervio hasta alcanzar los centros procesadores del cerebro. Una vez procesada la información se genera una respuesta eferente (en la corteza motora precentral) que viaja por las vías eferentes hasta alcanzar el plexo mientérico (respuesta contráctil) y el submucoso (respuesta secretora).

Ver más detalles en texto (modificada de Coss-Adame y cols²⁰⁶. 2014).

3.4.2 El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)

La respuesta al estrés comienza en las áreas corticales sensoriales del cerebro que captan los estímulos estresantes. Desde aquí la información viaja a diversas regiones cerebrales encargadas de su procesamiento²⁰⁷.

La corteza cingulada y la corteza prefrontal están especialmente implicadas en la respuesta al estrés y actúan mediante la activación o inhibición de las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). La activación de las neuronas parvocelulares hace que secreten el factor liberador de corticotropina (CRF) desde la eminencia media del hipotálamo al sistema venoso portal. El CRF alcanza la adenohipófisis²⁰⁸ donde estimula la síntesis de la hormona adenocorticotropa (ACTH)²⁰⁹. La ACTH al llegar a la circulación sistémica actúa a su vez sobre la corteza adrenal, donde se sintetizan los glucocorticoides²¹⁰. Los estímulos estresantes psicológicos o físicos provocan un impulso neuronal que activa las células secretoras del NPV produciendo la liberación del CRF, que a su vez estimula la liberación de ACTH y la producción de glucocorticoides en la corteza adrenal. Por otra parte los glucocorticoides ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis disminuyendo la secreción de CRF en el hipotálamo y de ACTH en la hipófisis^{211, 212}.

3.5. Estrés y disfunción intestinal

El estrés psicológico es una causa bien conocida de disfunción intestinal²¹³. Los síntomas asociados al estrés psicológico incluyen, entre otros, las náuseas o vómitos, el dolor abdominal y la alteración del ritmo intestinal²¹⁴; muchas de estas respuestas fisiológicas al estrés están mediadas por el eje HHA. Recientemente se ha llamado la atención sobre el efecto del CRF no sólo a nivel del SNC sino por su acción directa a nivel intestinal, al modular la respuesta al estrés, incluyendo su efecto sobre posibles cambios en la composición de la microbiota.

El CRF y otros miembros de la familia de señalización de CRF, incluyendo la urocortina (Ucn) 1, Ucn2 y Ucn3, son los mediadores

neuroendocrinos del estrés más importantes y mejor conocidos^{215, 216}. La liberación del CRF y las urocortinas en el SNC median las respuestas autonómicas, hormonales y conductuales al estrés, y su liberación en el TGI estimula el SNE para modular la motilidad gastrointestinal y la secreción²¹⁷. Por otro lado, las células inmunes, los nervios regionales sensitivos y simpáticos, las células enterocromafines y las células entéricas liberan CRF y urocortinas en el tracto gastrointestinal para modular la función mucosa y la motilidad gastrointestinal²¹⁸ (**figura 7**).

A continuación se describen los efectos más importantes descritos del estrés sobre la función intestinal, tanto en lo que respecta a la motilidad como a la función de barrera intestinal, incluyendo la producción de moco, la secreción de agua e iones y la permeabilidad intestinal.

3.5.1 Estrés y dismotilidad

Uno de los aspectos más importantes de la función intestinal es la regulación de la motilidad y, con ello, su capacidad de movilizar tanto los nutrientes como los productos de desecho. Durante los episodios de estrés, la liberación de CRF y su unión posterior a los receptores (CRF1 y CRF2) puede afectar a la motilidad intestinal. Los efectos fisiológicos directos de los miembros de la familia del CRF dependen del tipo de receptor de la familia CRF expresado en el órgano diana. Por ejemplo, el CRF2 es el predominante en el estómago de las ratas y parece mediar una reducción en la motilidad gástrica²¹⁹. Por el contrario, la activación cólica del receptor CRF1 aumenta la motilidad en dicha región.

3.5.2 Estrés y barrera intestinal

Diferentes tipos de estrés (agudo o crónico, físico o psicológico, etc.) influyen en las propiedades de la función de barrera intestinal, incluyendo la secreción de moco, agua e iones, la permeabilidad intestinal y la flora intestinal, tanto en humanos como en modelos animales²²⁰.

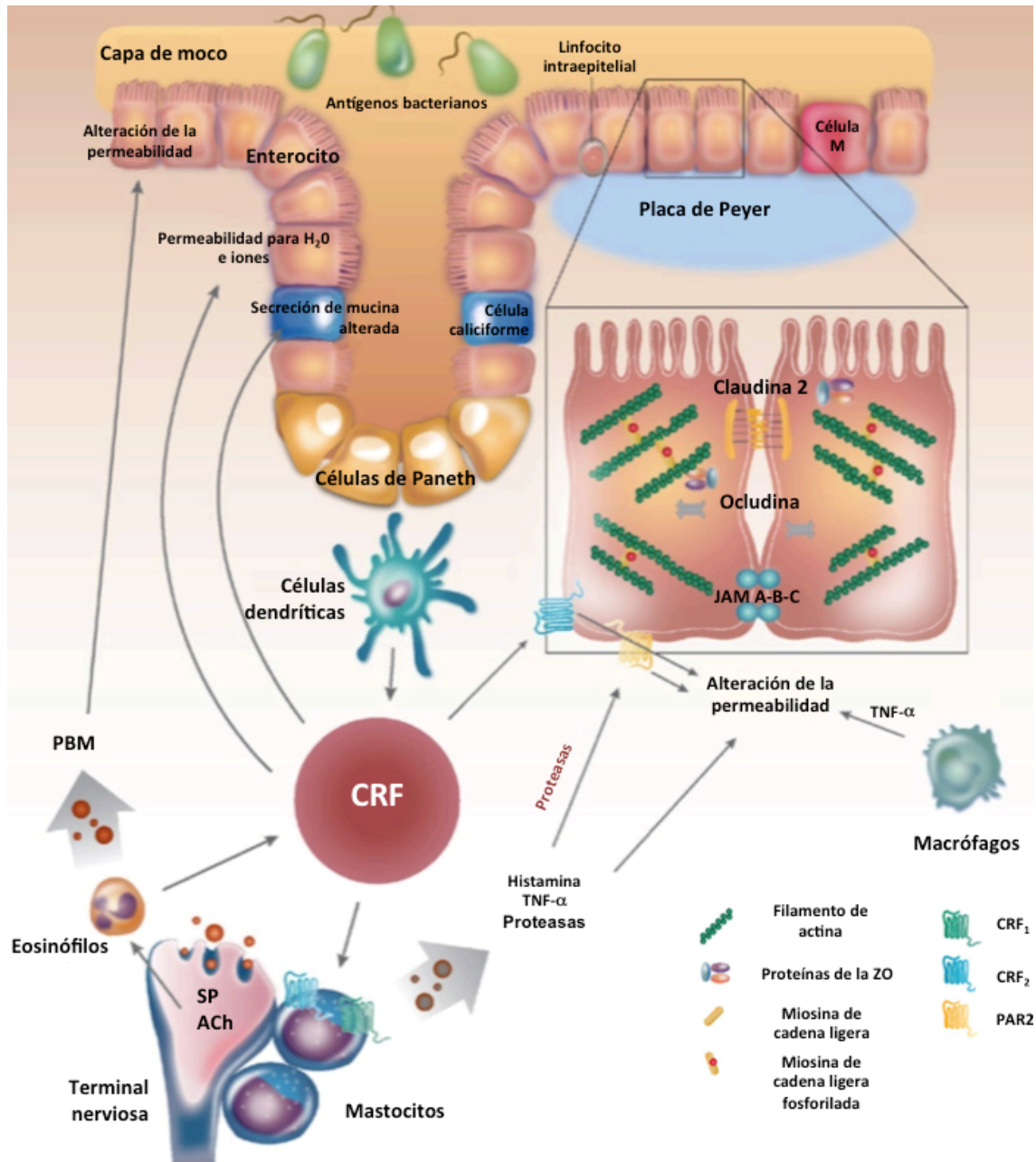


Figura 7.- Esquema de la acción del CRF sobre la permeabilidad intestinal en situaciones de estrés.

JAM-A-B-C, *junctional adhesion molecule* A-B-C; SP, sustancia P; ACh, acetilcolina; PBM, proteína básica mayor; CRF, corticotropin-releasing factor; CRF₁, receptor CRF 1; CRF₂, receptor CRF 2; PAR2, receptor activado por proteasas 2; ZO, *zonula occludens* (modificada de Rodiño-Janeiro y cols. 2015²²¹).

3.5.2.1 Producción de moco

El moco que recubre la superficie mucosa intestinal es producido por las células caliciformes, que a su vez expresan el receptor CRF1²²². Se ha demostrado en explantes cólicos de ratas sometidas a inmovilización, que el estrés aumenta la liberación de mucina e incrementa la secreción por parte de los mastocitos de la proteasa II y la prostaglandina E2. La inyección intracerebral o intravenosa de CRF en ratas no estresadas reprodujo estos cambios asociados al estrés, mientras que la administración de un antagonista del CRF (CRF- α -helicoidal) o de un estabilizador de los mastocitos (lodoxamida) lo inhibía²²³. Estos cambios se abolían en los ratones deficientes en mastocitos, lo que subraya el papel crucial del eje CRF-mastocito en la liberación de mucina mediada por estrés²²⁴. Por el contrario, ratas sometidas a estrés crónico presentan una disminución de mucina y un número reducido de células caliciformes en el colon distal, asociado a un aumento de la adhesión bacteriana, lo cual podría suponer un primer paso hacia la disfunción de barrera intestinal²²⁵.

3.5.2.2 Secreción de agua e iones

La secreción de agua e iones también evita la adhesión de patógenos y sustancias nocivas a la superficie mucosa, y las diluye y propulsa a través del intestino para minimizar su penetración en la *lamina propria*. Existen pruebas en modelos animales que indican que en respuesta a estrés agudo y crónico se produce un aumento de la secreción de agua e iones²²⁶; esto se reproduce también con la administración periférica de CRF²²⁷.

Estudios experimentales en humanos también han demostrado que el estrés físico o psicológico modula la barrera intestinal. En los años 80 del siglo pasado Barclay y Turnberg demostraron, usando técnicas de perfusión segmentaria en el yeyuno humano, que el estrés agudo reduce la absorción

nete de agua o aumenta su secreción, lo que apoyaba el papel del SNC y SNA en el control de la función intestinal^{228, 229}.

3.5.2.3 Permeabilidad intestinal

Existen numerosos estudios que demuestran el aumento de la permeabilidad intestinal secundario a la aplicación de estrés agudo o crónico. En modelos experimentales en roedores, diferentes tipos de estrés agudo y crónico (estrés por inmovilización, estrés mixto acústico y por inmovilización, etc.) aumentan la conductancia tisular y los flujos de H³-manitol, ⁵¹Cr-EDTA, y peroxidasa de rábano en el yeyuno, íleon y colon²³⁰⁻²³⁵. Estos resultados indican la capacidad del estrés para modular el transporte paracelular y transcelular de iones y pequeñas y grandes moléculas. Los cambios inducidos por el estrés se acompañan en muchos casos de una alteración directa de las TJ²³⁶ (**figura 8**).

Los mecanismos que de forma más importante se han relacionado con estas anomalías de la permeabilidad inducidas por el estrés son: liberación de acetilcolina (ACh), histamina, kinasa de miosina de cadena ligera, y citoquinas como el interferón- γ , la interleucina IL-4 e IL-13 y la activación de mastocitos²³⁷⁻²⁴¹.

Otra línea de investigación en modelos animales destaca la importancia del eje estrés-CRF-mastocito en la regulación de la permeabilidad intestinal. Los mastocitos se comunican de forma bidireccional con el SNE, el SNC, y el SNA a través de mediadores mastocitarios y neuropéptidos²⁴². Además los mastocitos sintetizan y secretan tanto el CRF como la Ucn en respuesta a la activación del receptor de IgE²⁴³. El aumento de la permeabilidad intestinal en respuesta al estrés por inmovilización o a la administración intraperitoneal de CRF se redujo o se abolió con el pre-tratamiento con doxantrazol (un estabilizador mastocitario)²⁴⁴. De igual forma la inhibición farmacológica de la activación mastocitaria se ha demostrado que inhibe la permeabilidad intestinal inducida por estrés en diferentes modelos animales²⁴⁵⁻²⁴⁷.

La importancia de los mastocitos también se observa en los pacientes con SII, donde existe una inflamación crónica de bajo grado en la que se observa un aumento del número de mastocitos respecto de los controles sanos²⁴⁸.

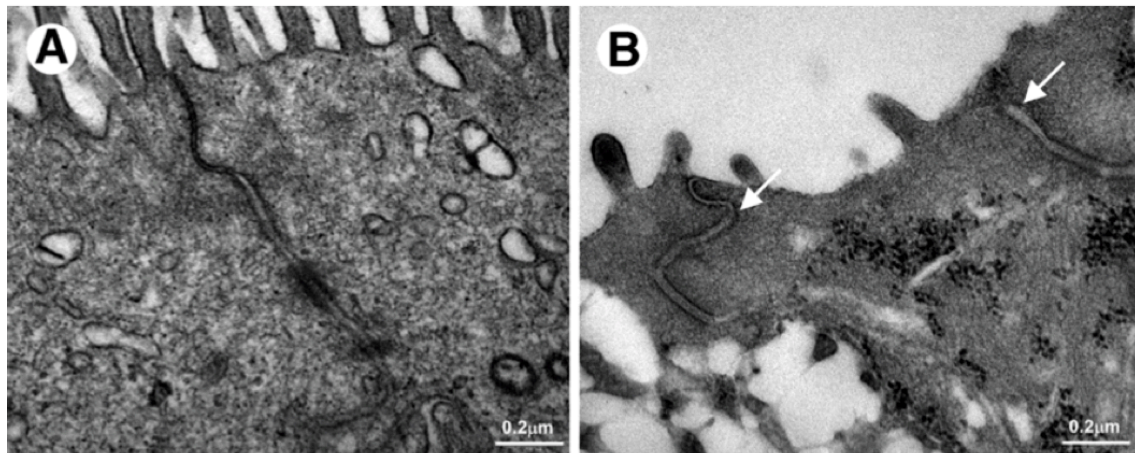


Figura 8.- Microfotografía electrónica de la región TJ. Células epiteliales cólicas de ratas controles (A) y animales expuestos a estrés por inmovilización durante 6 horas (B). Las flechas blancas señalan las TJ. (Ponferrada y cols. 2007²³⁶).

Otro estudio en humanos con un modelo psicológico de estrés (estrés producido por hablar en público) y, en otro grupo, la administración de un bolo único de CRF endovenoso, ha encontrado un aumento de la permeabilidad intestinal medido mediante el cociente lactulosa/manitol; dos semanas de pretratamiento con un estabilizador de mastocitos (cromoglicato disódico) bloquearon el efecto del estrés, lo cual indica la importancia de la participación del eje CRF-mastocito en esta respuesta²⁴⁹.

3.5.3 Estrés y disbiosis

Existen datos que indican que el estrés induce disbiosis de la microbiota intestinal con la subsiguiente dismotilidad, inflamación e incremento de la permeabilidad²¹³.

En modelos animales de estrés se ha demostrado que el estrés produce cambios en la microbiota intestinal en ratones²⁵⁰. Otros investigadores, empleando un modelo experimental murino de depresión, encontraron que estos ratones tenían alterada la microbiota intestinal y la motilidad cólica²⁵¹. En un modelo de hipersensibilidad visceral inducida por estrés, el tratamiento de las ratas con rifaximina produjo un aumento relativo de *Lactobacilli* y revirtió la inflamación mucosa inducida por estrés, la hipersensibilidad visceral y la permeabilidad intestinal²⁵². La anulación de la patología inducida por estrés causada por la rifaximina puede ser secundaria al aumento de la población de *Lactobacilli*, ya que las ratas estresadas alimentadas de forma forzada con *Lactobacillus farciminis* y *paracasei* presentan una reducción de la alteración de la permeabilidad intestinal y una reducción de la hipersensibilidad visceral comparados con los controles^{253, 254}.

La influencia del estrés sobre la microbiota intestinal también se ha estudiado en humanos. En un estudio que valoraba los contenidos fecales de 3 astronautas, se encontró que *Bacteroides fragilis* subespecie *thetaiotaomicron* se incrementó en todos los astronautas tras su confinamiento en una cámara de entrenamiento espacial (*Skylab*)²⁵⁵. Otro estudio encontró una reducción en el recuento de bacterias ácido-lácticas en las heces de estudiantes en épocas de estrés²⁵⁶.

Otro dato a favor de esta alteración de la microbiota en humanos relacionada con el estrés es la alteración de la microbiota observada en pacientes con SII²⁵⁷, y la mejoría de la sintomatología de los mismos tras el tratamiento con rifaximina²⁵⁸.

4. Sistema endocannabinoide

4.1. Introducción al sistema cannabinoide

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en la planta del cáñamo (*Cannabis sativa*), tanto en sus hojas y brotes florecidos como en la resina que secreta. Esta planta contiene más de 420 compuestos químicos de los que 60 son hidrocarburos aromáticos exclusivos de esta especie vegetal²⁵⁹.

El empleo de esta planta a lo largo de la historia ha sido muy extendido, tanto con fines terapéuticos como formando parte de rituales religiosos o sociales. Las primeras pruebas sobre la acción terapéutica de preparados del cannabis provienen de China, donde se empleaba hace más de 5000 años. Desde ese momento, numerosos documentos describen las diferentes aplicaciones medicinales en distintas sociedades. La utilización del cannabis en el mundo occidental comenzó a comienzos del siglo XIX.

En 1942, Adams describió la estructura de una serie de tetrahidrocannabinoles²⁶⁰ (denominados cannabinoides), proponiendo que estos eran los componentes activos de la marihuana.

El término “cannabinoide” se acuñó como un nombre colectivo para denominar a una serie de compuestos hidrocarburos aromáticos (unos 60) que existen de forma natural en la planta *Cannabis sativa*^{261, 262}.

Sin embargo, este término se emplea actualmente de forma general para denominar a todos los compuestos naturales o sintéticos que pueden producir las acciones de los cannabinoides derivados de las plantas o que tienen estructuras muy similares a los mismos²⁶³. Posteriormente apareció el término de “fitocannabinoide” para denominar los cannabinoides producidos por el cannabis. Un fitocannabinoide, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC; **figura 9**) – aislado por primera vez por Gaoni y Mechoulam en 1964 - es el principal constituyente psicoactivo del cannabis²⁶⁴ y es uno de los cannabinoides aprobados para uso médico.

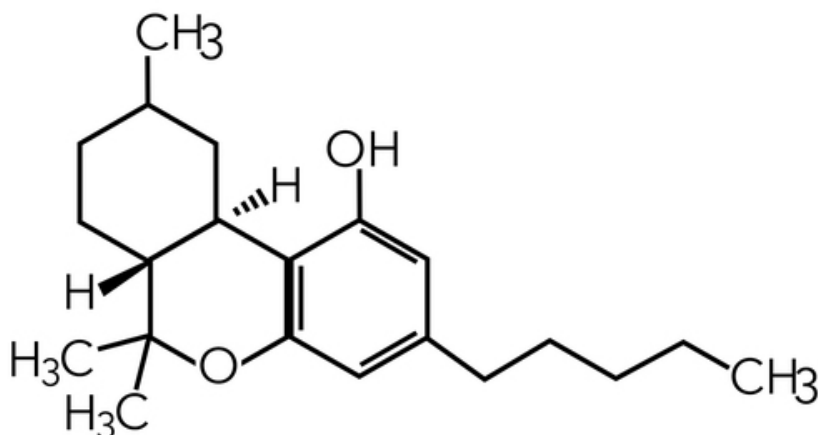


Figura 9.- Estructura del Δ^9 -tetrahydrocannabinol

4.2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) es el conjunto formado por los dos receptores acoplados a la proteína G receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2), los compuestos endógenos que pueden unirse a estos receptores (endocannabinoides), y las enzimas y procesos responsables de la biosíntesis, el metabolismo y la recaptación celular de los endocannabinoides²⁶⁵.

El CB1 fue el primero en ser caracterizado de forma radiométrica²⁶⁶, identificándose después su estructura molecular tanto en ratas²⁶⁷ como en humanos²⁶⁸. El CB1 está altamente conservado entre diferentes especies, con una homología de secuencia entre el humano y el de rata del 90% y entre el humano y el de ratón del 91%²⁶⁹. Los CB1 se expresan en las terminales de las neuronas centrales y periféricas, desde donde median la inhibición de la liberación de diversos neurotransmisores²⁶⁵. La expresión de CB1 es mayoritariamente presináptica, en axones y terminales nerviosos, donde puede mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisores; también se ha descrito en las dendritas y el soma de neuronas²⁷⁰. En el tracto gastrointestinal el CB1 se localiza fundamentalmente en las neuronas de los plexos mientérico y submucoso, aunque también se expresa en células epiteliales²⁷¹. El CB1 es

el responsable en humanos de la mayor parte de los síntomas producidos por el consumo de marihuana²⁷².

Tras la caracterización del CB1 se describió la del CB2 en células del sistema inmune²⁷³. La distribución de los CB2 es claramente distinta de los CB1. Los receptores CB2 se localizan generalmente en las células del sistema inmunológico y cuando se activan pueden modular la migración de células inmunológicas y la liberación de citoquinas, tanto dentro como fuera del cerebro^{273, 274}. En el tracto gastrointestinal el receptor CB2 se localiza sobre todo en células inflamatorias y epiteliales, aunque se ha descrito también su localización en neuronas del plexo mientérico y submucoso^{275, 276}. Los receptores CB1 y CB2 interaccionan con proteínas G i/o de forma que, por ejemplo, inhiben la adenilato ciclasa y activan las proteín-kinasas activadas por mitógenos (**figura 10**). También las proteínas G i/o del receptor CB1 pueden mediar la activación de los canales de potasio, y la inhibición de canales de calcio del tipo N y P/Q; los receptores CB1 también pueden señalizar a través de las proteínas Gs.

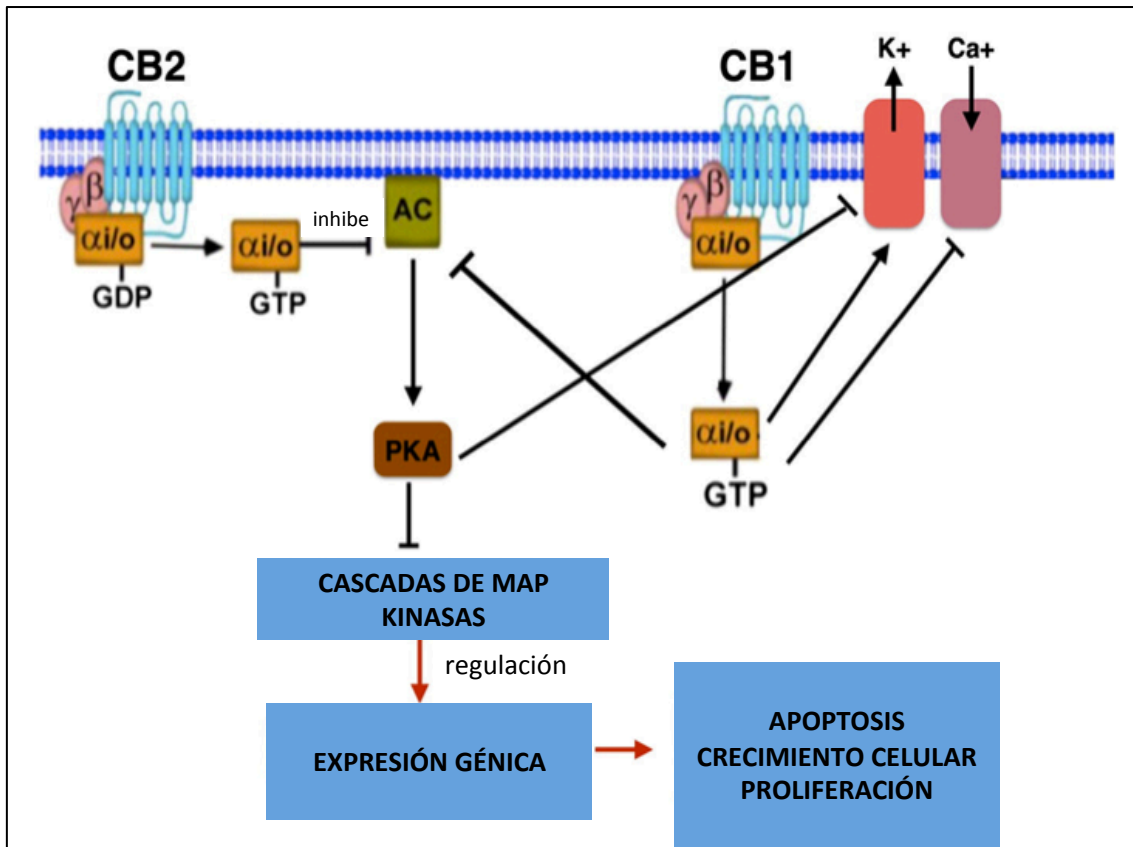


Figura 10.- Señalización a través de CB1 y CB2. Tanto el CB1 como el CB2 están asociados con proteínas G. La activación de éstas lleva a la inhibición de la actividad adenilato ciclasa y a la activación de diferentes cascadas de MAP kinasas. Aparte, el receptor CB1 regula negativamente los canales de calcio voltaje dependientes y regula positivamente los canales rectificadores de potasio. El receptor CB1 puede también inducir la elevación de calcio libre intracelular a través de la activación de la fosfolipasa-C (FLP-C). La inhibición mediada por cannabinoides de la proteína quinasa A (PKA) lleva a la inhibición de la expresión génica a través de un descenso del adenilato monofosfato cíclico (AMPc). También produce la activación de cascadas de MAP kinasas relacionadas con la supervivencia celular y la apoptosis. Estas vías de señalización están directamente relacionadas con la variedad de funciones reguladas por los receptores cannabinoides (modificado de Katchan y cols²⁷⁷).

Respecto de los endocannabinoides, los dos primeros descritos fueron la anandamida (N-araquidonoiletanolamina, AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), ambos sintetizados a demanda en respuesta a un aumento de los niveles de calcio intracelular²⁶⁵. Aparte de estos dos primeros endocannabinoides se han descrito posteriormente los siguientes: éter de noladina, dihomogamma-

linolenoiletanolamida, virodhamina, oleamida, docosahexaenoiletanolamida, eicosapentaenoiletanolamida, esfingosina, docosatetraenoiletanolamida, N-araquidonoildopamina, N-oleoildopamina, y hemopresina (**figura 11**).

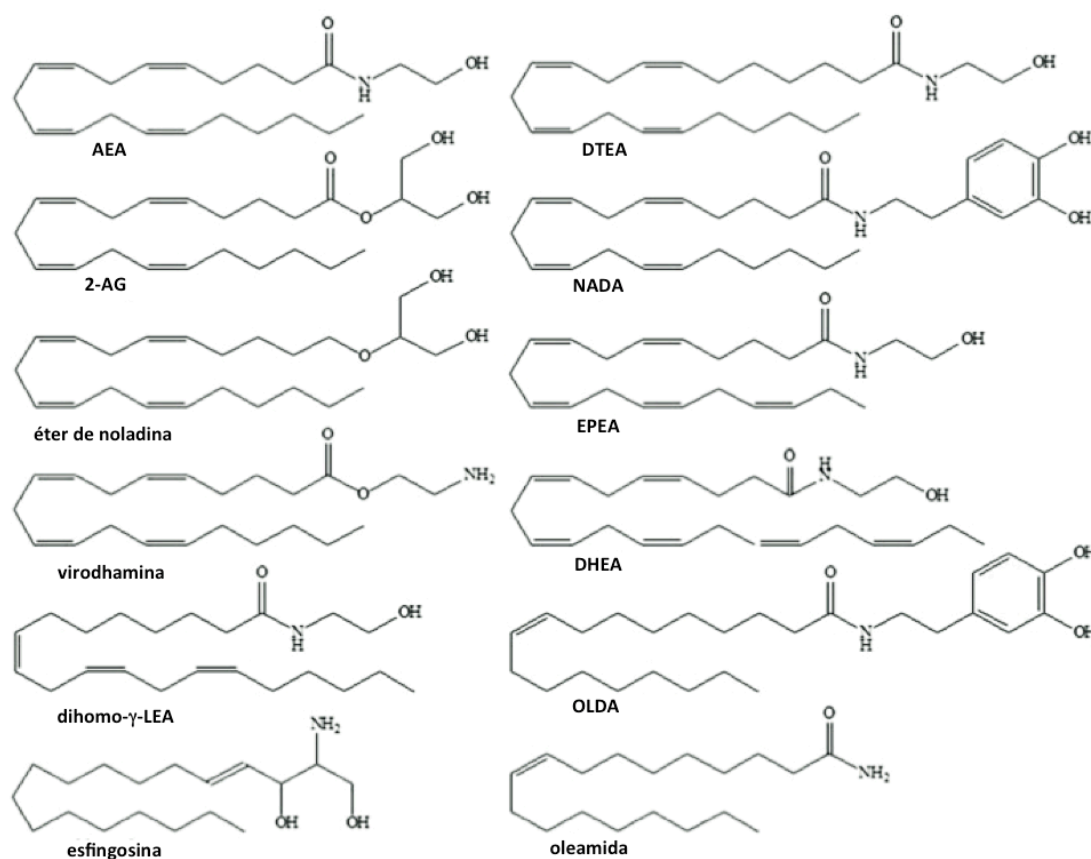


Figura 11.- Estructura molecular de los endocannabinoides. AEA (anandamida), 2-AG (2-araquidonoilglicerol), éter de noladina, virodhamina, dihomogamma-LEA (dihomo-γ-linolenoiletanolamida), esfingosina, DTEA (docosatetraenoiletanolamida), NADA (N-araquidonoildopamina), EPEA (eicosapentaenoiletanolamida), DHEA (docosahexaenoiletanolamida), OLDA (N-oleoildopamina), y oleamida (modificado de Pertwee²⁷⁸).

Estos endocannabinoides, cuyas estructuras se muestran en la **figura 11**, deben ser clasificados como endocannabinoides ortostéricos. Esto se debe, en primer lugar a que se han detectado en uno o más tejidos de mamíferos en

diferentes estudios; en segundo lugar a que todos ellos se pueden unir a sitios ortostéricos en receptores endocannabinoides y, en tercer lugar – con la excepción de la oleamida y la N-oleoildopamina – a que se pueden unir a estos receptores con valores de K_i o IC_{50} en rango micromolar, con lo que su potencia queda bien demostrada.

Existen también, al menos, otros tres compuestos endógenos que parecen interaccionar con los sitios alostéricos de los receptores cannabinoides como moduladores alostéricos tanto positivos como negativos. Estos tres compuestos son el pepcano-12, la lipoxina A_4 y la pregnenolona²⁷⁸.

Los endocannabinoides se sintetizan a demanda a partir de fosfolípidos de membrana y se liberan de las células de forma inmediata tras su producción²⁷⁹. Después de la activación del receptor cannabinoide por los mismos y la subsiguiente respuesta biológica asociada, los endocannabinoides se inactivan a través de un proceso de recaptación mediado por un transportador endocannabinoide de membrana, seguido de una degradación enzimática por la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) en el caso de la AEA o la monoacilglicerol lipasa (MAGL), y posiblemente también la FAAH, en el caso del 2-AG^{271, 280, 281}. Estas enzimas catalíticas se han identificado también en el tracto digestivo^{282, 283}.

Aparte de sus efectos sobre los receptores cannabinoides, la anandamida puede activar el receptor transitorio vallinoide tipo 1 (TRPV 1), que se expresa fundamentalmente en las neuronas primarias aferentes, y el receptor huérfano acoplado a proteína G GPR55^{284, 285}.

(Consultada página web: <http://www.guidetopharmacology.org> IUPHAR con fecha de 25 de febrero de 2017)

4.3. Sistema endocannabinoide en el tubo digestivo

4.3.1 Sistema endocannabinoide y motilidad intestinal

La motilidad del tubo digestivo está regulada por el SNE, que expresa los componentes clave del SEC: receptores cannabinoides, FAAH y MAGL²⁸⁶.

Los agonistas de CB1 disminuyen la contractilidad en el estómago, íleon y colon de roedores y la contractilidad del íleon y colon en humanos a través de la inhibición de la liberación de ACh^{286, 287}.

La inhibición in vivo de FAAH y MAGL en el intestino de ratón aumenta los niveles de AEA y 2-AG respectivamente, y se asocia a una disminución de la motilidad^{275, 282, 288}. La AEA parece jugar un papel importante en la regulación del reflejo peristáltico en el SNE de roedores²⁸⁹. Al contrario que el CB1, el CB2 no parece implicarse en el control de la motilidad, salvo en situaciones de inflamación intestinal²⁸³. En un estudio en humanos usando dronabinol (Δ^9 -THC de síntesis) se observó que el CB1 está implicado en la acomodación gástrica²⁹⁰ mientras que el tránsito del intestino delgado y del colon no estaban influidos por el dronabinol²⁹¹; sin embargo tras emplear un esquema diferente de dosis de dronabinol se apreció una relajación del colon y una reducción de la motilidad y del tono cólico postprandial²⁹². Estudios recientes sugieren que la contractilidad intestinal está controlada por una interrelación dinámica entre mensajeros retrógrados (los endocannabinoides y las purinas – como la adenosina trifosfato, ATP -) que actúan de manera opuesta. Se propone que las acciones excitadoras sobre la contractilidad del ATP están mediadas por incrementos de ACh, que a su vez se inhiben por la activación de los CB1 presinápticos en los nervios entéricos^{293, 294} (**figura 12, D**).

Los endocannabinoides también parecen estar implicados en la motilidad intestinal en modelos experimentales de EII. Los ratones *knock-out* para el CB1 (CB1^{-/-}) presentan un funcionamiento electrofisiológicamente alterado del colon comparado con los controles²⁹⁵. En otro estudio el empleo de un agonista cannabinoide (CP 55940) retrasó la hipermotilidad intestinal en un modelo murino de inflamación intestinal²⁹⁶.

En pacientes con SII (con diarrea y diarrea alternante) el uso de dronabinol inhibe la motilidad cólica en ayunas pero no afecta a la sensibilidad o tono cólicos²⁹⁷.

Los endocannabinoides, en resumen, controlan el tono fisiológico y la excitabilidad predominantemente mediante los CB1; sin embargo, en circunstancias patológicas, el SEC parece controlar sólo ciertos aspectos de la motilidad, actuando también sobre otros receptores no CB1²⁹⁸.

4.3.2 Sistema endocannabinoide y señalización cerebro-intestinal

4.3.2.1 Sensación visceral

La hipersensibilidad visceral es un síntoma común en las enfermedades gastrointestinales, incluyendo el SII. No está totalmente aclarado cuál es el origen de esta percepción visceral aumentada, habiéndose propuesto factores como la alteración en el tránsito intestinal de gases, cambios en la composición de la microbiota intestinal, variaciones en el sistema serotoninérgico de las células enterocromafines, la inflamación crónica y las alteraciones en el eje intestino-cerebro, entre otras¹⁵⁶.

Usando agonistas sintéticos se ha demostrado que la activación de CB1 y CB2 disminuye el dolor visceral en modelos de distensión abdominal en roedores y que, en estados de inflamación cólica, la administración del antagonista de CB1 rimonabant aumenta la hipersensibilidad en el mismo modelo²⁹⁹. Sin embargo, la administración de dronabinol (Δ^9 -THC) en voluntarios sanos y a pacientes con SII no redujo la percepción de distensión rectal^{292, 297, 300}.

4.3.2.2 Sabor graso

Existen pruebas que sugieren que los mamíferos –incluyendo a los humanos– desarrollan una marcada preferencia por las comidas grasas basada en sus propiedades específicas de palatabilidad³⁰¹. De hecho, aparte de los 5 sabores primarios establecidos (dulce, salado, amargo, ácido y umami), se ha propuesto recientemente la existencia de un sexto sabor primario de las grasas que se ha denominado “oleogustus”³⁰². Diversos estudios sugieren que el SEC intestinal juega un papel crucial en la modulación de la ingesta grasa debido a sus específicas propiedades gustativas³⁰³⁻³⁰⁶. Estos estudios demuestran que los alimentos grasos apetitosos que contienen grasas insaturadas se consumen y son preferidas por las ratas, en parte, por la activación del SEC a través de CB1 en el intestino delgado proximal, que estimula positivamente al cerebro para reforzar la ingesta “hedonista” (ingesta no homeostática dirigida por el propio placer de la misma). Estudios recientes en humanos refuerzan esta idea de que la ingesta “hedonista” se asocia con un aumento de la señalización mediada por el SEC³⁰⁶.

4.3.2.3 Sensación general de hambre

Datos recientes sugieren también la implicación del SEC de la capa mucosa del intestino delgado de una manera muy relevante como señal general de hambre³⁰⁷. Los niveles de 2-AG en la mucosa yeyunal aumentan tras el ayuno de manera tiempo-dependiente, cuando se compara con ratones con alimentación *ad libitum*, alcanzando una diferencia estadísticamente significativa a las 24h de la retirada de la comida. Los aumentos de 2-AG iban en paralelo con aumentos en el precursor del 2-AG, 1,esteatoril,2-araquidonil-sn-glicerol (SAG) a las 24h del ayuno (**figura 12, B**). Tanto el SAG como el 2-AG volvían a los valores basales normales tras 15 minutos de realimentación con pienso. Estos datos sugieren la conversión mediante la acción de la diacilglicerol lipasa (DAGL) de SAG a 2-AG, lo que se confirmó mediante la administración de orlistat, inhibidor de la DAGL.

Resultados previos sugerían que la señalización colinérgica y una señal periférica desconocida en ese momento eran cruciales para mantener la alimentación en un modelo experimental en ratas^{308, 309}. Teniendo en cuenta los datos anteriormente descritos, se propone que la neurotransmisión colinérgica en los receptores muscarínicos de ACh (mAChR) controla la producción de 2-AG, lo cual a su vez activa los CB1 locales y sirve como una señal general de hambre para el organismo (**figura 12, B y C**). De hecho, en un estudio reciente se ha demostrado la expresión de RNAm de CB1 en una subpoblación de células enteroendocrinas del duodeno que se sabe que controlan la cuantía de la ingesta³¹⁰ (**figura 12, C**).

4.3.3 Sistema endocannabinoide y secreción intestinal

Aunque el cannabis se haya utilizado tradicionalmente en ciertas culturas para tratar la disentería y la diarrea, muy pocos estudios han investigado el efecto de los cannabinoides en el transporte iónico y de fluidos. En experimentos en cámaras de Ussing se ha demostrado que la activación de CB1 produce un efecto antisecretor por mecanismos neuronales que implican la inhibición de liberación de neurotransmisores de las neuronas del plexo submucoso^{311, 312}. En experimentos *in vivo* con ratones se ha demostrado que la activación del CB1 reduce la hipersecreción inducida por la toxina del cólera en el intestino delgado³¹³.

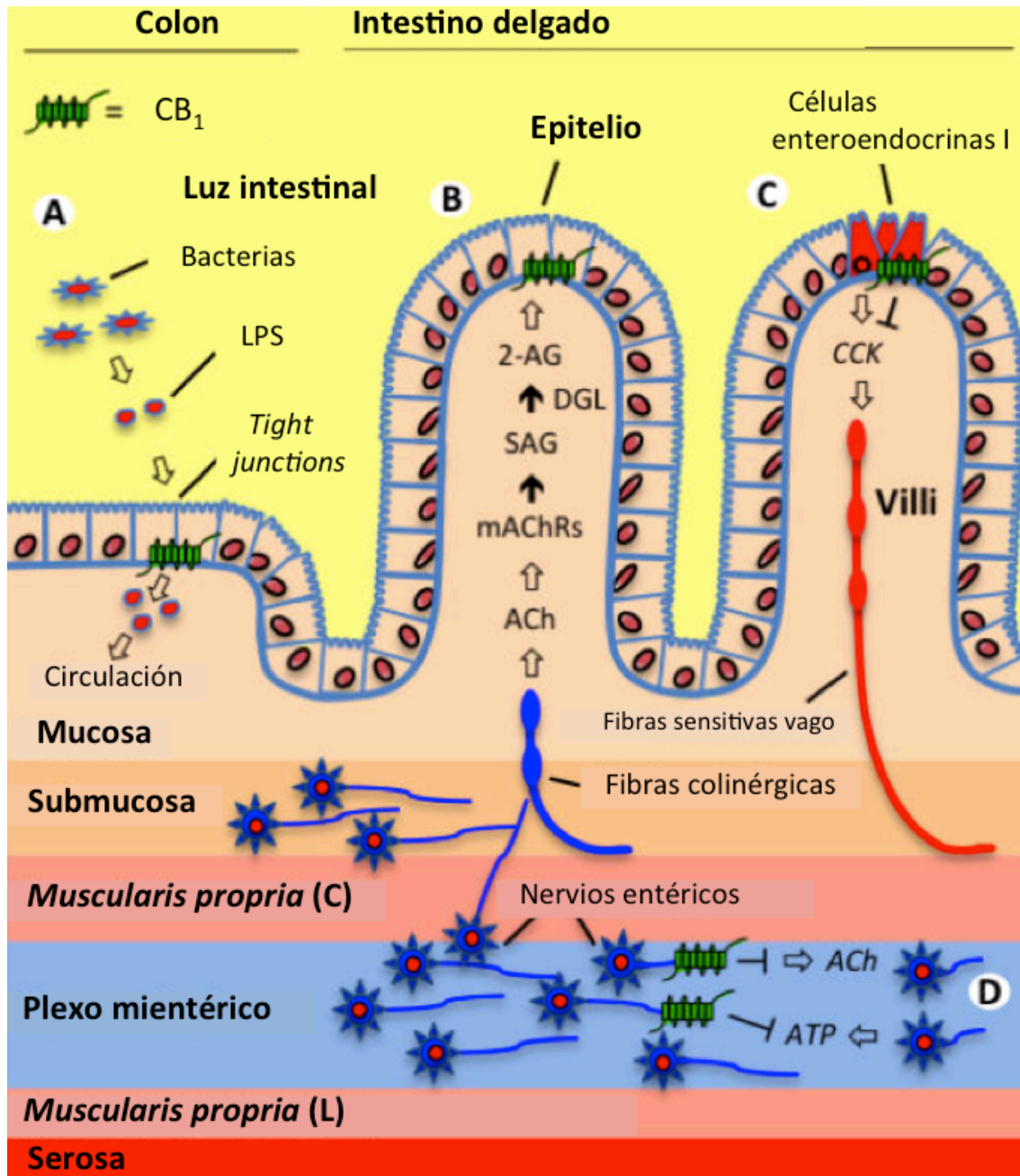


Figura 12.- Efecto del sistema endocannabinoide sobre diversas funciones gastrointestinales.

A) El sistema endocannabinoide en el colon parece interactuar con la microbiota intestinal y regular la permeabilidad de la barrera intestinal. La activación de los CB₁ en ratones aumenta los niveles circulantes de LPS. **B)** La señalización endocannabinoide en la mucosa del yeyuno se activa por el ayuno y las dietas grasas, y parece ser una señal general de hambre que actúa sobre los CB₁ locales para inhibir la saciedad. **C)** La actividad endocannabinoide de CB₁ en las células enteroendocrinas tipo I -que producen y secretan la colecistoquinina (CCK)- promueve la ingesta tras el ayuno y favorece la comida de alimentos ricos en grasas. **D)** El CB₁ en los nervios entéricos controla la contractilidad intestinal, inhibiendo la liberación de ACh. La

contractilidad parece regularse mediante una interrelación entre los mensajeros retrógrados – cannabinoides y purinas (ATP)- que actúan de manera opuesta. (modificada de DiPatrizio, 2016³¹⁴).

4.3.4 Sistema endocannabinoide y la emesis

Tanto la náusea como el vómito son dos síntomas desagradables de causas muy diversas (infección, quimioterapia, gestación, etc.) que pueden beneficiarse del empleo de tratamiento cannabinoide^{315, 316}. Las regiones del bulbo raquídeo que propagan el vómito se encuentran en el complejo dorsal del vago y expresan tanto CB1 como CB2^{317, 318}. Diversos estudios en modelos animales y en humanos han demostrado que los endocannabinoides son mensajeros importantes en las redes neuronales que controlan el vómito y la náusea, por lo que la manipulación farmacológica de la degradación de endocannabinoides puede representar una opción terapéutica para el tratamiento de la emesis^{315, 319}.

Una reciente revisión de la iniciativa Cochrane³²⁰ sobre el empleo de cannabinoides para el tratamiento de los vómitos inducidos por quimioterapia en pacientes adultos incluyó 23 ensayos controlados aleatorizados; los pacientes que recibieron tratamientos basados en cannabinoides experimentaron menos náuseas y vómitos que los pacientes tratados con placebo. Los derivados cannabinoides no demostraron mayor eficacia que los tratamientos antieméticos convencionales, pero sí experimentaron en mayor número efectos adversos tales como sensación de “estar colocado”, mareo, sedación o disforia. A pesar de ello, en los ensayos en los que los pacientes recibieron tanto el tratamiento con cannabinoides como los antieméticos convencionales, la mayor parte de los pacientes prefirió el tratamiento cannabinoide. Los ensayos analizados fueron, en general, de baja calidad metodológica, y empleaban tanto regímenes de quimioterapia como tratamientos antieméticos de los años 1980 y 1990. La conclusión general de los autores es que los tratamientos basados en derivados cannabinoides pueden ser útiles para el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por

quimioterapia en pacientes no respondedores al tratamiento antiemético estándar.

Por otro lado hay que destacar que se ha descrito un síndrome paradójico que aparece en los pacientes que consumen cannabis de forma crónica, que es el síndrome de emesis inducida por cannabinoides, una forma distinta al síndrome de vómitos cíclicos. Se caracteriza por aparecer en pacientes que consumen cannabis de forma crónica, que presentan episodios cíclicos de náuseas y vómitos (que motivan múltiples visitas a urgencias) y que se alivian con baños frecuentes de agua caliente³²¹. El mecanismo por el que se produce este síndrome no está claro, pero se ha sugerido que el uso crónico del Δ^9 -THC asociado a su larga semivida puede inducir un “efecto de reintoxicación farmacológica” durante las fases de ayuno por el fenómeno de acumulación en tejido graso. La justificación de por qué los baños calientes pueden aliviar los síntomas tampoco se conoce con exactitud; se ha sugerido que el cannabis incrementa la temperatura central corporal mientras que reduce la temperatura cutánea, por lo que los baños calientes aumentarían el flujo de sangre cutáneo y disiparían la elevada temperatura central corporal³²².

4.3.5 Sistema endocannabinoide y la microbiota intestinal

Varios estudios recientes sugieren la relación entre el SEC y la microbiota intestinal³²³. El primer estudio que relaciona alguna cepa bacteriana específica con el SEC se publicó en el año 2007³²⁴. En ese trabajo se observó que la administración de *Lactobacillus acidophilus* a ratas modulaba la expresión de los receptores cannabinoides y los receptores opioides- μ en las células del epitelio intestinal, reduciendo la percepción de dolor abdominal por los animales.

En un estudio en el que se trató durante 4 semanas con un agonista no selectivo de receptores cannabinoides (HU-120) a ratones, se observó un aumento de los niveles plasmáticos de lipopolisacárido (LPS), que es una endotoxina liberada por las bacterias Gram-negativas³²⁵ (**figura 12, A**). Por el contrario, el tratamiento con rimonabant, antagonista CB1, durante 12 días en

ratones obesos *ob/ob* con disrupción de la barrera intestinal redujo los niveles plasmáticos de LPS y los cambios en la localización de las proteínas de las TJ (occludina y ZO-1)³²⁶.

Por otro lado se han encontrado cambios en la expresión de RNAm de CB1 en el colon de ratones tratados con probióticos, en ratones *germ-free* y después del tratamiento con antibióticos o tras el acceso a una dieta rica en grasas³¹⁴.

Estos datos, aunque preliminares, sugieren que el SEC puede regular de alguna manera la composición de la microbiota, y que esta relación sea bidireccional.

4.3.6 Sistema endocannabinoide y enfermedad inflamatoria intestinal

Tanto CB1 como CB2 parecen ejercer un efecto protector sobre la EII, y múltiples estudios apoyan el potencial valor terapéutico de actuar sobre los mismos para conseguir beneficios clínicos²⁸⁶.

Por ejemplo, se ha estudiado la administración intracólica de aceite de mostaza (agente inductor experimental de colitis grave) a ratones para valorar los efectos de la estimulación de CB1 y CB2³²⁷. En dicho estudio el tratamiento con agonistas selectivos de CB1 (ACEA) o de CB2 (JWH133) redujo de forma significativa el daño producido por el aceite de mostaza, incluidos los cambios inflamatorios intestinales y la diarrea.

El papel específico del CB2 en modelos experimentales se ha estudiado usando un modelo de colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), tanto en ratones CB2^{-/-} como controles WT. En este estudio se observó que la colitis inducida por TNBS se inhibía con el tratamiento con JWH133 o con el empleo de otro agonista CB2 (AM1241). Estos efectos se bloqueaban con el pre-tratamiento con un antagonista de CB2 (AM630) y se exacerbaban si se usaba sólo tratamiento con AM630³²⁸. De hecho, el incremento de los niveles de AEA endógena bloqueando su degradación por la FAAH mediante el uso de URB597 (inhibidor selectivo de la FAAH) o con el inhibidor de la recaptación de endocannabinoides (VDM11) redujo de forma

significativa la inflamación inducida por TNBS³²⁹. Todos los efectos de los tratamientos farmacológicos estaban ausentes en los ratones CB1^{-/-} y CB2^{-/-}.

Un reciente estudio realizado en Italia en pacientes pediátricos con EII ha encontrado que existe asociación entre una variante genética funcional de CB2 (Q63R) y la predisposición a padecer EC³³⁰. De hecho, la presencia de dicha variante era un marcador de gravedad tanto para EC como para CU en dichos pacientes.

En estudios en humanos se ha observado que la AEA y la enzima que la sintetiza están disminuidas en pacientes con CU, y que la expresión de CB2 y las enzimas responsables de la síntesis y degradación de 2-AG están aumentadas, lo cual sugiere que los cannabinoides pueden tener un efecto beneficioso sobre la EII³³¹.

Existen muy pocos estudios controlados en humanos sobre la eficacia de los cannabinoides para el tratamiento de los pacientes con EII. Un reciente estudio prospectivo controlado con placebo en 21 pacientes con EC³³², demostró que el cannabis (administrado en forma de cigarrillos de 115 mg cada 12h de Δ^9 -THC) induce la remisión clínica en el 45% de los pacientes (frente al 10% del grupo placebo), a pesar de que un 80% de los mismos eran no-respondedores o intolerantes a tratamiento previo con anti-TNF- α . Se observó una respuesta clínica del 90% en el grupo tratado con cannabis frente al 40% del grupo tratado con placebo ($p=0,028$).

Un reciente ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en pacientes con colitis ulcerosa leve-moderada, publicado solamente en forma de resumen³³³ y presentado en la reunión de la Organización Europea de Crohn y Colitis Ulcerosa (*European Crohn's and Colitis Organization*), que empleó un compuesto de cannabidiol (GWP42003), no encontró diferencias en su objetivo primario, que era la remisión en semana 10 (28% grupo GWP42003 vs 26% grupo placebo).

Estudios de cohortes y estudios observacionales sí han encontrado mejoría subjetiva de los pacientes que consumen cannabis, tanto en variables como el dolor abdominal y la diarrea³³⁴, como en la necesidad de empleo de otros tratamientos para el control de su enfermedad de base³³⁵.

Algunos pacientes con EII utilizan el cannabis de forma habitual para incrementar el apetito³³⁶; en un estudio con 13 pacientes que recibieron cannabis durante 3 meses se observó un incremento de peso estadísticamente significativo³³⁷.

Finalmente, en una encuesta realizada en el año 2004 a pacientes ambulatorios con EII en España³³⁸ cerca del 10% de los individuos reconocían consumir marihuana y un porcentaje similar hachís. En la mitad de casos, el consumo de estas drogas se producía de forma regular y frecuente (diaria o semanal). El 95% de ellos las consumían ya previamente al diagnóstico de la EII; el 30% creía que mejoraba los síntomas de su enfermedad digestiva, mientras que la misma proporción creía que podían ser perjudiciales; sólo una tercera parte lo había comentado en alguna ocasión con su médico.

En resumen, parece que el tratamiento cannabinoide puede tener efecto beneficioso en pacientes con EII, pero hacen falta más datos que establezcan qué tipo de cannabinoide debe emplearse, a qué dosis y la vía de administración del mismo, y los subgrupos de pacientes que potencialmente podrían obtener mayor beneficio²⁷⁷.

4.3.7 Sistema endocannabinoide y función de barrera intestinal

Existen escasos datos que relacionan el posible efecto del SEC sobre la función de barrera intestinal. En un estudio *in vitro* para valorar la permeabilidad del epitelio intestinal en el que monocapas de células Caco-2 fueron tratadas con citoquinas proinflamatorias (INF- γ y TNF- α) para inducir una respuesta inflamatoria y producir un aumento de permeabilidad, el empleo de Δ^9 -THC o cannabidiol (ambos derivados de la planta *Cannabis sativa*) redujo los efectos sobre el aumento de la permeabilidad producidos por el tratamiento con citoquinas, mientras que la AEA o el 2-AG aumentaron la permeabilidad³³⁹.

Este mismo grupo había descrito un efecto similar tanto de los cannabinoides exógenos como endógenos en un modelo que también empleaba células Caco-2, pero sin ser pre-tratadas para conformar un medio

proinflamatorio³⁴⁰. El distinto efecto de los cannabinoides exógenos frente a los endógenos sugiere la existencia de un complejo mecanismo de acción cannabinoide en estos procesos que deberá ser evaluado en futuros estudios; puede ser que el mismo receptor estimule vías de señalización distintas dependiendo del agente que lo active.

Por otro lado, parece que el empleo de agonistas de CB2 redujo de forma discreta el daño mucoso proinflamatorio mediado por citoquinas en muestras de mucosa de colon humanas de voluntarios sanos, sin interferir sobre la función de barrera epitelial intestinal³⁴¹.

Estudios *in vivo* en un modelo de ratones obesos encontraron que el bloqueo de los CB1 con un antagonista del receptor durante 12 días producía una reducción significativa de la permeabilidad intestinal demostrada de forma indirecta por una reducción en los niveles plasmáticos de LPS³²⁶. En ese mismo estudio el bloqueo de CB1 redujo los niveles plasmáticos de LPS, y esa reducción se asoció a cambios en la localización de proteínas de las TJ (ZO-1 y ocludina). La administración subcutánea crónica (durante 4 semanas) de un agonista del receptor cannabinoide (HU210) aumentó igualmente los niveles plasmáticos de LPS. Finalmente, estos mismos autores emplearon un modelo *in vitro* (células Caco-2) para valorar los efectos del SEC sobre la permeabilidad intestinal; la aplicación de LPS y HU210 disminuyó la expresión de RNAm de la ocludina y la ZO-1, mientras que el antagonista del receptor de CB1 normalizó los niveles de expresión de ocludina y ZO-1. El empleo de un antagonista de CB2 (SR144528) no produjo cambios en los parámetros de permeabilidad.

Por tanto, no queda completamente aclarado el papel del SEC sobre la función de barrera intestinal. Parece que el CB2 no interviene en la permeabilidad intestinal según dos estudios *in vitro*, mientras que el CB1 puede ejercer un papel distinto en función de si se activa mediante cannabinoides exógenos o endógenos.

Hipótesis y objetivos

Antecedentes inmediatos

1. El papel del sistema endocannabinoide sobre la función de barrera intestinal no está completamente aclarado.
2. Existen datos que apoyan la actividad antiinflamatoria endógena del CB1, dado que ratones que no expresan CB1 tienen mayor afectación por colitis que los ratones WT^{34, 295}.
3. La administración de agonistas de cannabinoides³²⁷ o el bloqueo de la degradación de endocannabinoides³²⁹ han demostrado proteger frente a diversas formas de colitis inducida en modelos animales.
4. El estrés inducido experimentalmente es un buen modelo artificial de daño estructural y funcional de la barrera intestinal^{236, 342}.

Hipótesis

El receptor cannabinoide tipo 1 modula la función de barrera intestinal en ratones expuestos a estrés acústico y por inmovilización.

Objetivos

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto del estrés acústico y por inmovilización sobre la expresión de CB1 y las enzimas de síntesis y degradación del sistema endocannabinoide intestinal
2. Estudiar el papel de CB1 en la permeabilidad epitelial paracelular cólica y la translocación bacteriana tras exposición a estrés.
3. Determinar el papel de CB1 en la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon tras exposición a estrés.
4. Evaluar el efecto de CB1 sobre la secreción cólica de IgA tras la exposición al estrés.
5. Valorar el efecto del estrés acústico y por inmovilización sobre los niveles plasmáticos de corticosterona en ratones WT y CB1^{-/-} y su influencia en la permeabilidad epitelial.

Material y métodos

1. Animales

Se usaron en todos los experimentos ratones macho adultos modificados genéticamente deficientes del receptor CB1 (CB1^{-/-}) y ratones WT CD1. En total se emplearon en los experimentos 114 animales.

La generación de ratones que carecen del CB1 ha sido descrita previamente por el grupo de investigación de Ledent³⁴³. Los ratones CB1^{-/-} fueron cedidos por el Dr. Jorge Manzanares (Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante).

Los ratones WT y CB1^{-/-} usados en cada experimento procedían de las mismas camadas y se emparejaron por edad y sexo (edad = 10-12 semanas; peso = 25-30 g).

Los ratones se mantuvieron a una temperatura constante de 23 ± 2°C y bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12-h:12-h (luz desde las 8:00 hasta las 20:00 h) con acceso libre a comida y agua. Todos los animales se mantuvieron en condiciones constantes durante 1 semana previamente a la inducción del estrés.

Los experimentos se realizaron entre las 10:00 y las 13:00 h.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los estándares más estrictos del cuidado de animales, monitorizando su salud y minimizando el dolor y el sufrimiento, de acuerdo con las directrices del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo a la legislación española (RD 53/2013, de 1 de febrero) y Europea vigentes (2010/63/EU). Con el objetivo de minimizar al máximo el sufrimiento animal y el número de animales empleado, se aplicaron los principios de las tres erres (reducir, reemplazar y refinar) siempre que fuera posible. Al final de esta sección se adjunta una copia del diploma de la “Acreditación para la utilización de animales en experimentación: categoría B” del autor de la Tesis.

2. Grupos experimentales

Se usaron los siguientes grupos ($n = 6-9$ en cada grupo): grupos de ratones controles WT y CB1^{-/-} (los animales se manipularon durante unos segundos a las 11:00 h) y grupos de estrés subagudo de WT y CB1^{-/-} (ver más abajo) sacrificados inmediatamente después de la última exposición a estrés.

Por otra parte, varios grupos de ratones WT recibieron inyecciones subcutáneas del antagonista de CB1 rimonabant (SR141716A, Sanofi-Aventis, Montpellier, Francia) o vehículo, ambos bajo condiciones controladas y de estrés subagudo. El rimonabant (dosis de 3mg/kg y 10 mg/kg) se disolvió en una solución vehículo (50 μ L de Tween-80 en 3 mL de dimetilsulfóxido al 2,5% en salino³⁴) y se inyectó al comienzo de la sesión diaria de estrés. El fármaco se inyectó vía subcutánea (20 mL/kg de peso) bajo anestesia superficial con isoflurano.

Para modular los efectos glucocorticoideos los ratones CB1^{-/-} ($n = 8$) recibieron inyecciones intraperitoneales del bloqueante de la síntesis de corticoides metirapona [2-metil-1, 2-di-3-piridil-1-propanona (Sigma)] (100mg/kg) antes de cada sesión de estrés.

3. Protocolo de estrés

Los ratones fueron expuestos a estrés acústico y por inmovilización (EAI) usando un baño de ultrasonidos (2h, de 13.00h a 15.00h durante 4 días) tal y como se ha descrito previamente³⁴⁴ usando tubos de Corning de 50 ml de 11,5 cm de longitud, con tapones modificados con un pequeño agujero para colocar la cola del ratón. Se hicieron unos orificios en los laterales del extremo cónico del tubo para asegurar una adecuada ventilación (**figura 13**). Los tubos no permitían movimientos hacia delante, hacia atrás ni rotatorios de los ratones.

El estrés acústico se indujo con un aparato de emisión randomizada de ultrasonidos (19 y 25 kHz con picos de 0-35 dB) (UD200SH-6L, Sonitech) que impedía la posible adaptación del animal al estrés³⁴⁴.

Debido al ciclo circadiano inherente a la producción de corticosterona, la inmovilización se realizó a las 10:00 h en todos los experimentos, y todos los animales fueron sacrificados usando pentobarbital sódico (320 mg/kg, ip; Vetoquinol, Lure, Francia) a la misma hora.

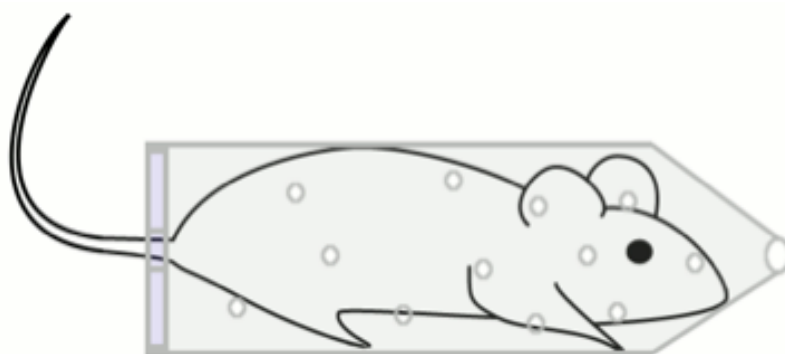


Figura 13.- Figura del cono de inmovilización.

4. Justificación del modelo

El método de producción de estrés empleado es el de EAI, clasificado como mixto (físico y psicológico), predecible, inescapable y apto para estudiar los efectos del estrés³⁴⁴. La elección de este modelo se debe a su amplia utilización previa por diversos grupos y a la propia experiencia del grupo investigador donde se ha realizado esta Tesis^{345, 346}.

El protocolo elegido es más sencillo de interpretar que otros modelos de estrés, como el estrés social por hacinamiento, aislamiento o lucha³⁴⁷. Asimismo es un modelo de alta reproducibilidad que puede repetirse en protocolos de estrés crónico³⁴⁸. El estrés inducido por inmovilización provoca cambios psicológicos y físicos que causan una gran variedad de alteraciones conductuales y fisiológicas³⁴⁹.

La evaluación por separado o a la vez de los modelos de EAI concluye que su combinación obtiene una respuesta superior y más predecible³⁵⁰.

5. Identificación de proteínas por Western blot

Se tomaron 2 cm de la parte distal del colon (entre el ángulo esplénico y el recto) y tras la limpieza de las heces se llevó a cabo la extracción en fresco de proteínas, congelando una pequeña porción inmediatamente en hielo seco y conservándola a -80 °C para posteriores análisis.

Tras determinar y ajustar los niveles de proteínas, los homogeneizados de tejido (TyssueLyser, QUIAGEN®) una vez centrifugados (12.000g, 20 m, a 4°C) se mezclaron con una mezcla de buffer Laemmli (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos) con β -mercaptoetanol (50 μ l por 950 μ l de Laemmli), y 15 μ g se cargaron en un gel de electroforesis de SDS-acrilamida (90 mV). Una vez separadas por peso molecular, las proteínas de los geles fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot® Midi Nitrocellulose (BioRad®, EEUU) mediante el sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad®, EEUU) durante 10 minutos a 2,5 A y 2,5 V. Tras ser bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con leche desnatada o albúmina de suero bovino (PanReac, Alemania) al 5%, se incubaron con anticuerpos específicos en un buffer Tris-salino y con detergente tipo Tween 20 (BioRad, EEUU) al 0,1% (TBS-Tween) durante toda la noche: COX2 policlonal de ratón (1:1.000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, Estados Unidos), NOS2 policlonal de ratón (1:500, Santa Cruz), CCL28 (0,2 μ g/ml; R&D, Mineápolis, Minnesota, Estados Unidos), ocludina policlonal de ratón (1:1.000, ThermoFisher), CB1 policlonal de ratón (1:1000, Abcam), CB2 policlonal de ratón (1:1000, Cayman), PLD-NAPE policlonal de ratón (1:1000, Cayman), DAGL policlonal de ratón (1:750, Santa Cruz), FAAH policlonal de ratón (1:1000, Cayman), MAGL policlonal de ratón (1:1000, Cayman) y NOGO policlonal de ratón (1:1000, Santa Cruz). Tras tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween, las membranas se incubaron con la dilución adecuada en TBS-

Tween del anticuerpo secundario específico correspondiente (1:2000 anti-rabbit Sta. Cruz, 1:2000 anti-mouse GE Healthcare, 1:4000 1%BSA anti-goat Abcam) durante 1,5h. El revelado se realizó, tras otros tres lavados con TBS-Tween, por quimioluminiscencia aplicando el kit Amersham ECL Prime (GE Healthcare, Reino Unido) que permite la oxidación del luminol catalizada por la peroxidasa acoplada a los anticuerpos secundarios. La detección de la quimioluminiscencia emitida se registró con el equipo Odyssey® Fc Imager (LI-COR®, EEUU). Las bandas se cuantificaron por densitometría con el programa Image J, del NIH y se analizaron varias exposiciones de tiempo para asegurar la linealidad de las intensidades de banda. Como control de carga se utilizó la β -actina.

6. Valoración de la permeabilidad cólica

Los ratones fueron anestesiados superficialmente con isoflurano. En los grupos de estrés los experimentos se llevaron a cabo justo al terminar la última sesión de estrés. Para medir la permeabilidad paracelular cólica, se insertó un catéter de 1 mm de diámetro vía rectal a 2 cm del ano. Posteriormente se perfundió a su través lentamente en el colon ^{51}Cr -EDTA (1,5 μCi) (Perkin Elmer España, Madrid, España) en 0,3 ml de NaCl al 0,9%. Tras dos horas los ratones fueron sacrificados usando pentobarbital sódico, y se extrajo sangre mediante punción cardíaca que se anticoaguló con citrato trisódico (3,15% peso:volumen, 1 volumen de citrato por cada 9 volúmenes de sangre). Para medir la radiactividad de las muestras se utilizó un contador gamma (1470 Gammacounter Wallac Wizard, Perkin Elmer®, Boston, Massachussets, USA). Los resultados fueron expresados en porcentaje de permeado, considerando el 100% como la diferencia entre la radiactividad total de una alícuota de 1 ml de la solución instilada (1.5 μCi) y la de una alícuota de 1 ml de suero salino.

7. Análisis de la translocación bacteriana

Los ratones fueron anestesiados, se les rasuró la piel del abdomen y se esterilizó posteriormente con una solución iodada. Tras el sacrificio—se extrajeron los ganglios mesentéricos linfáticos, bazo e hígado en condiciones de esterilidad, se pesaron y homogeneizó la misma cantidad de cada tipo de tejido en 2 mL de solución salina estéril para los posteriores cultivos microbiológicos dentro del estudio de la translocación bacteriana desde el intestino.

Los medios de cultivo utilizados fueron Agar sangre y Agar MacConkey 5% para el recuento de bacterias aerobias y Agar Brucella Sangre suplementado con vitamina K1 y hemina para las anaerobias. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C para las aerobias y 48 horas para las anaerobias se procedió al recuento de UFCs, expresándolas por UFCs/mg de tejido. La identificación de las diferentes especies bacterianas se hizo mediante tinción de Gram y ensayos bioquímicos estándar. En el caso de los microorganismos aerobios, se emplearon los ensayos de la oxidasa (Mast Diagnostics®), discos antibióticos de optoquina, bacitracina y novobiocina (Mast®), coagulasa (Beckton Dickinson®), catalasa, y el sistema de identificación bioquímica BBLTM Enterotubo IITM (Difco Laboratories, Detroit, MI, EEUU). El sistema API 20 NE (Biomerieux®), se utilizó para los bacilos Gram – no fermentadores, y el API 20 Strep para *Enterococcus*. Para los anaerobios, se empleó el sistema de identificación Rapid ID 32 A (Biomerieux®).

Los experimentos de cultivos e identificación bacteriana se realizaron en colaboración con el equipo de investigación de la Dra. Gómez-Lus del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

8. Determinación de IgA

Los niveles de IgA cólicos fueron medidos usando un kit ELISA comercial disponible (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, Estados Unidos). Las muestras de colon fueron homogenizadas a 4°C en 4 volúmenes de buffer de homogenización que contenía 320 mmol/l de sacarosa, 1 mmol/l de DL-ditiotreitol, 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 2 µg/ml de aprotinina, 0,2% Nonidet P40 y 50 mmol/l de Tris llevado a un pH de 7,0 con HCl (buffer de homogenización). Los homogenizados se centrifugaron (13.000 g durante 20 minutos a 4°C) y los sobrenadantes se usaron para realizar las determinaciones de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

9. Determinación de corticosterona plasmática

Se realizó la medición de corticosterona plasmática al cabo de una hora de extraer la muestra de sangre mediante un kit comercial disponible de enzimoimmunoensayo (EIA) (Enzo, Plymouth, Pensilvania, Estados Unidos). Los valores obtenidos en los animales control ($25,3 \pm 8,1$ pg/ml) son comparables a los esperables en ratones adultos machos CD1 a la hora de la extracción sanguínea (≈ 12.00 h)³⁵¹.

10. Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados fueron de Sigma (Madrid, España) o los indicados previamente en cada apartado.

11. Análisis estadístico

Los resultados han sido expresados como la media \pm DE de los indicados en cada experimento.

Las comparaciones estadísticas se hicieron empleando el test de Mann-Whitney y la ANOVA unidireccional seguidas del test de Newman-Keuls.

Se consideró una $p < 0,05$ para la significación estadística. Cada muestra se analizó por duplicado o triplicado.



Resultados

1. Efecto del estrés acústico y por inmovilización sobre la expresión de CB1 y las enzimas de síntesis y degradación del SEC

Como punto de partida se realizó la medición de los niveles de CB1 en condiciones basales y tras la exposición a EAI en animales WT.

El EAI usando un baño de ultrasonidos (2h, de 13.00h a 15.00h durante 4 días) no modificó de forma significativa la expresión de CB1 (**figura 1**).

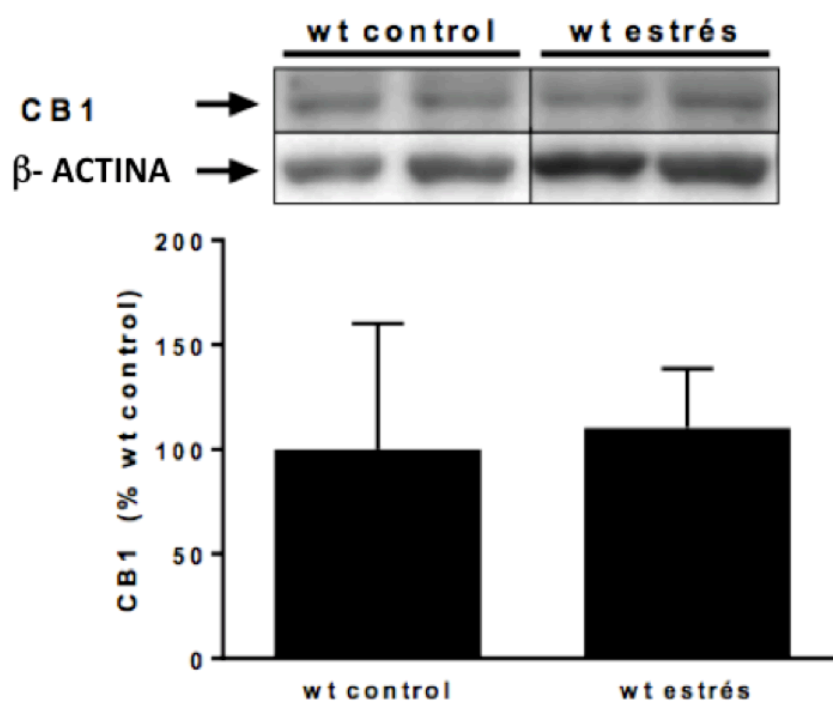


Figura 1: Expresión proteica del receptor endocannabinoide CB1

(gel representativo y análisis densitométrico de n = 5) en el colon de ratones WT en condiciones basales o expuestos a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría, y se comparó para la significación estadística.

(% respecto a wt control)

Se determinó la expresión de las enzimas de síntesis (DAGL y PLD-NAPE) y degradación (MAGL y FAAH) del SEC en ratones WT en condiciones basales y tras exposición a EAI.

El EAI no modificó de forma significativa la expresión de las enzimas de síntesis del SEC (DAGL y PLD-NAPE) pero sí aumentó la expresión de las de degradación (MAGL y FAAH) en los animales estresados (**figura 2**).

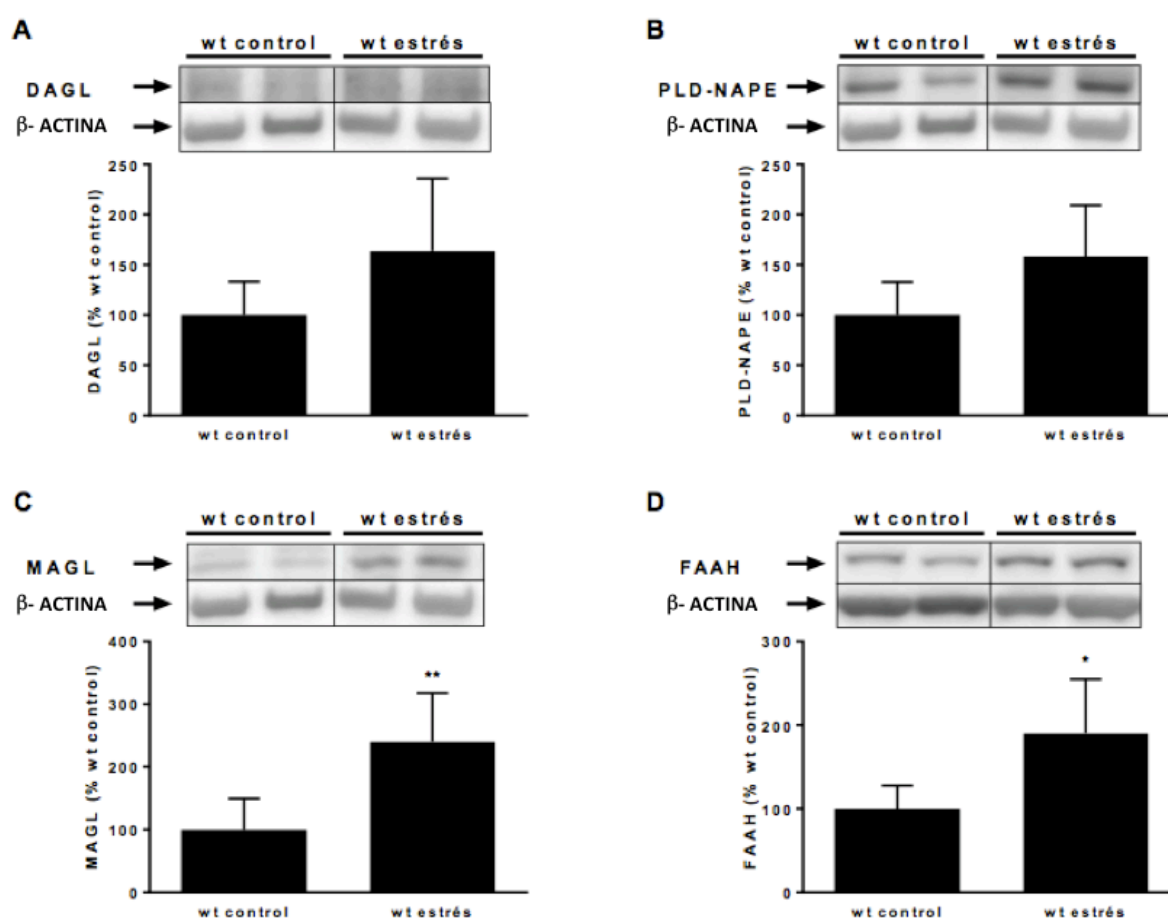


Figura 2: Expresión proteica de las enzimas de síntesis diacilglicerol lipasa (DAGL) (A) y fosfolipasa D de NAPE (PLD-NAPE) (B) y de degradación monoacilglicerol lipasa (MAGL) (C) y amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (D) del sistema endocannabinoide (gel representativo y análisis densitométrico de $n = 5$) en el colon de ratones WT en condiciones basales o tras exposición a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría, y se comparó para la significación estadística. (% respecto a wt control)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs wt control, animales no estresados

2. Papel del CB1 en la permeabilidad paracelular cólica y la translocación bacteriana tras exposición al estrés

El EAI indujo un incremento significativo de la permeabilidad cólica a ^{51}Cr -EDTA tanto en ratones WT como $\text{CB1}^{-/-}$ (figura 3).

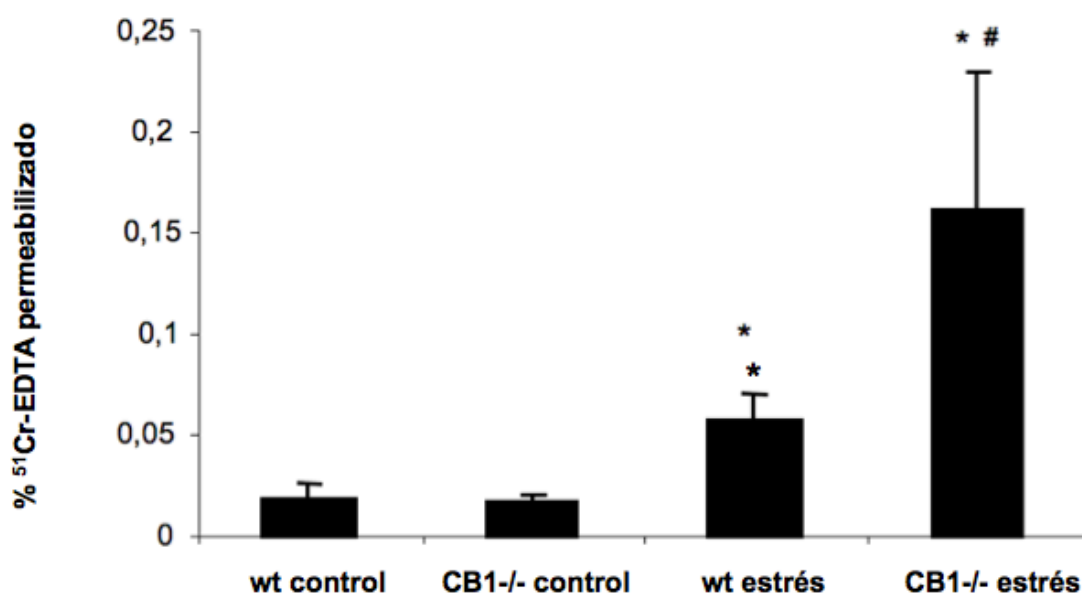


Figura 3: Permeabilidad cólica a ^{51}Cr -EDTA (expresada como el cociente entre el ^{51}Cr sanguíneo frente al total instilado y presentado como porcentaje) en ratones *wild type* (wt) y ratones *knock-out* para el receptor CB1 ($\text{CB1}^{-/-}$), en condiciones basales o tras exposición a estrés agudo y por inmovilización.

Los datos se presentan como medias \pm DE de 8 ratones.

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs animales estresados wt.

Tal y como se muestra en la figura, el grado de disfunción de la barrera intestinal asociado con el estrés fue significativamente mayor en los ratones $CB1^{-/-}$.

De forma paralela, el estrés indujo la translocación de diferentes especies bacterianas a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), tal y como se demuestra por el incremento significativo de UFC/g cultivado en los GLM de ratones expuestos a estrés en comparación con los animales control (**figura 4**).

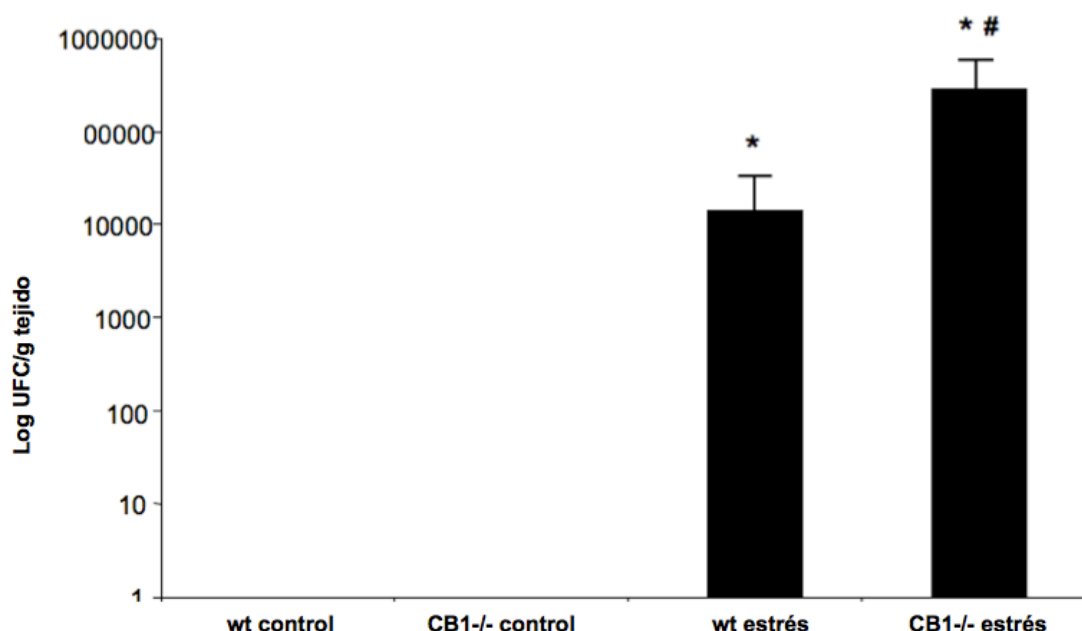


Figura 4: Translocación bacteriana a GLM en ratones wt y $CB1^{-/-}$ en condiciones basales y tras exposición a EAI. Los datos representan las medias \pm DE de 6 ratones. No se observó translocación bacteriana en los ratones wt y $CB1^{-/-}$ no expuestos a estrés.

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs animales estresados wt.

La caracterización de las especies aisladas mostró las habituales de la flora comensal cólica: *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus spp*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes* y *Micrococcus spp* entre otras.

Tal y como ocurrió en los experimentos de permeabilidad descritos previamente, se observó una cantidad significativamente superior de UFC/g en los GLM (**figura 4**), hígado y bazo de los animales CB1^{-/-} expuestos a estrés en comparación con los ratones WT.

El análisis de la expresión de la ocludina, una de las proteínas esenciales de los complejos de las TJ en los tejidos de mucosa cólica, no demostró diferencias entre los grupos experimentales en ratones WT y CB1^{-/-}.

La ausencia de cambios en la expresión proteica de ocludina ocurrió también empleando el antagonista farmacológico de CB1 rimonabant a la dosis de 3 y 10 mg/Kg (resultados de ésta última dosis en **figura 5**).

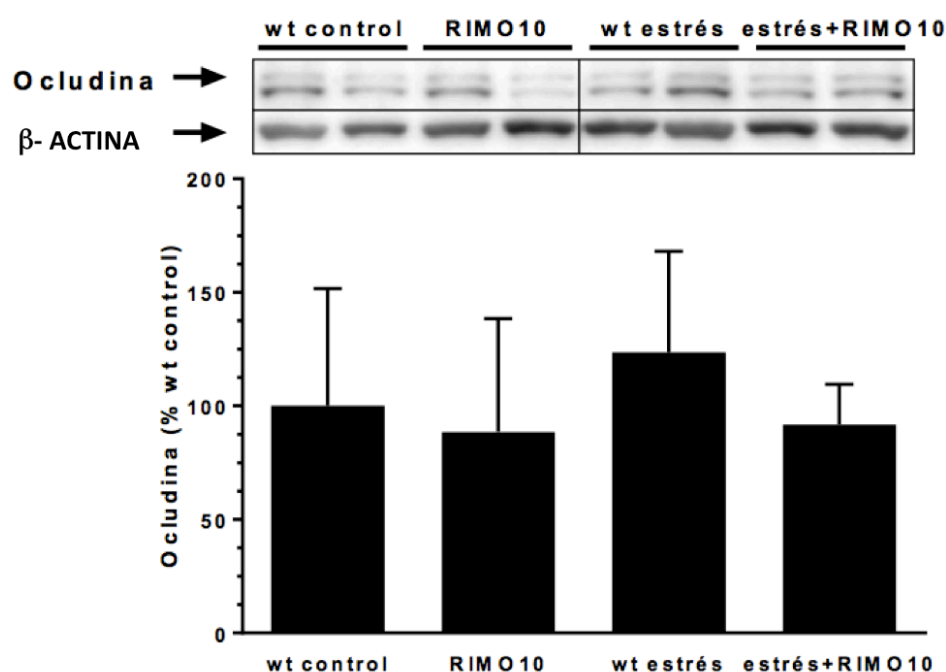


Figura 5: Expresión proteica de la ocludina (gel representativo y análisis densitométrico de $n = 5$) en el colon de ratones WT tratados con vehículo o con el antagonista farmacológico de CB1, rimonabant, a dosis de 10 mg/kg bajo condiciones controladas o expuestos a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría y se comparó para la significación estadística.

Tampoco se observaron cambios en la expresión de NOGO-B, proteína también implicada en la función de barrera intestinal tanto en humanos como en modelos de ratón IL-10^{-/-56}, usando el abordaje farmacológico con rimonabant a dosis de 10 mg/kg (**figura 6**).

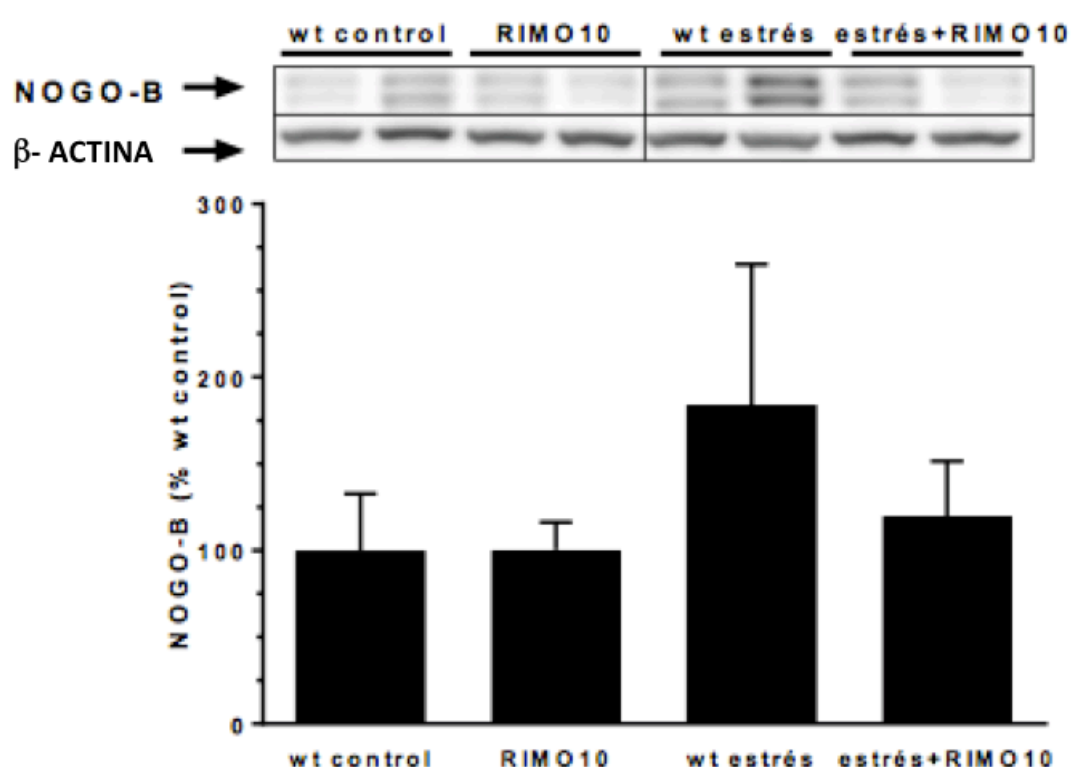


Figura 6: Expresión proteica de NOGO-B (gel representativo y análisis densitométrico de n = 5) en el colon de ratones WT tratados con vehículo o con el antagonista farmacológico de CB1, rimonabant (dosis de 10 mg/kg) en condiciones basales o expuestos a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría y se comparó para la significación estadística.

3. Papel del CB1 en la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon tras exposición a estrés

Para clarificar el posible papel del CB1 en la expresión de dos de las enzimas proinflamatorias más representativas (NOS2 y COX2) se estudió su expresión en las muestras de colon.

El EAI durante 4 días consecutivos se asoció con una mayor expresión de NOS2 y COX2 en la mucosa cólica de los ratones CB1^{-/-} comparados con los ratones WT (figuras 7 y 8).

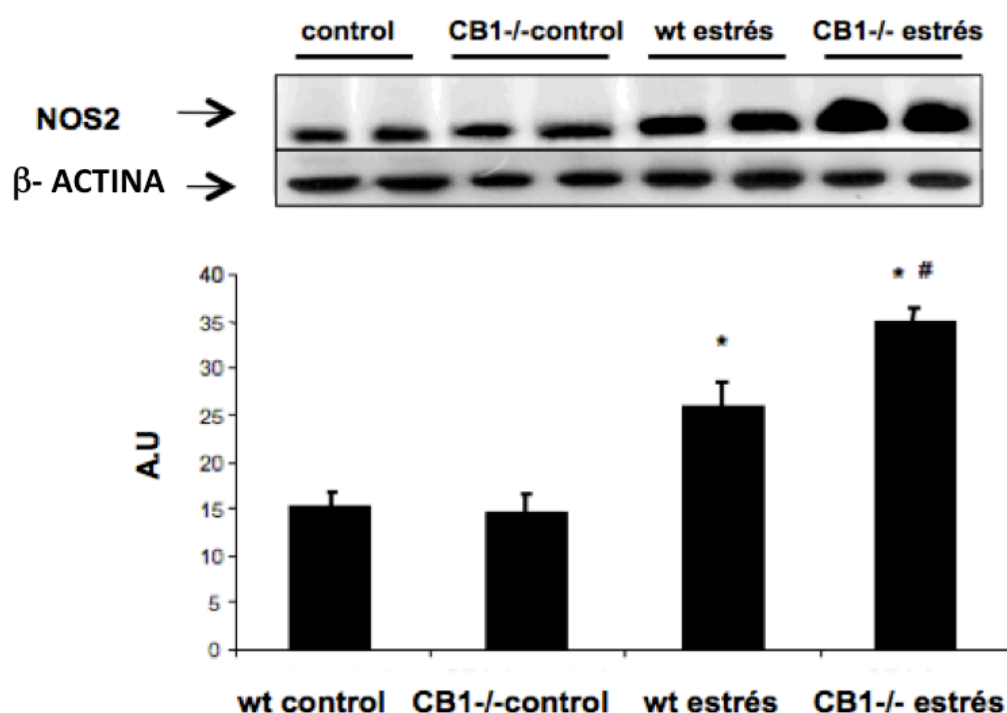


Figura 7: Expresión proteica de óxido nítrico sintasa (NOS2) (gel representativo y análisis densitométrico de n = 3) en el colon de ratones WT y CB1^{-/-} en animales en condiciones basales y tras exposición a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría, y se comparó para la significación estadística. (AU: unidades arbitrarias; *arbitrary units*)

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs ratones estresados wt.

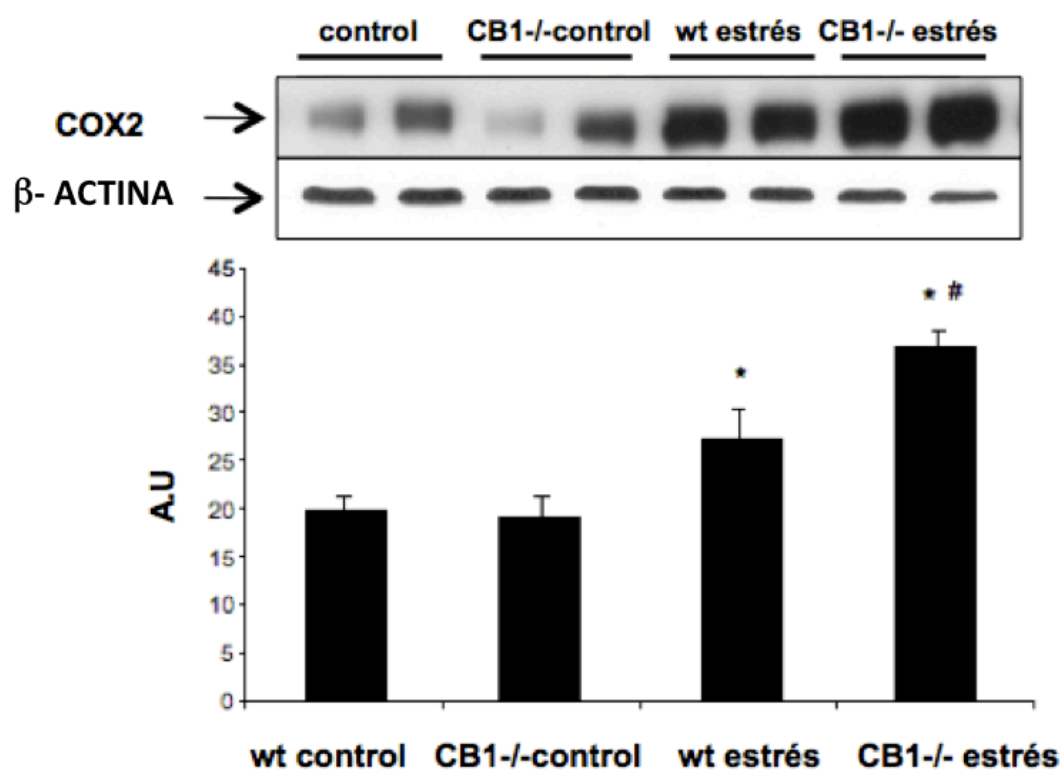


Figura 8: Expresión proteica de cicloxigenasa (COX2) (gel representativo y análisis densitométrico de $n = 3$) en el colon de ratones WT y CB1^{-/-} en condiciones basales y tras exposición a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría, y se comparó para la significación estadística. (AU: unidades arbitrarias; *arbitrary units*)

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs ratones estresados wt.

Estos resultados se reprodujeron utilizando un abordaje farmacológico, empleando un antagonista del CB1 (rimonabant, 3 mg/kg) (**figuras 9 y 10**).

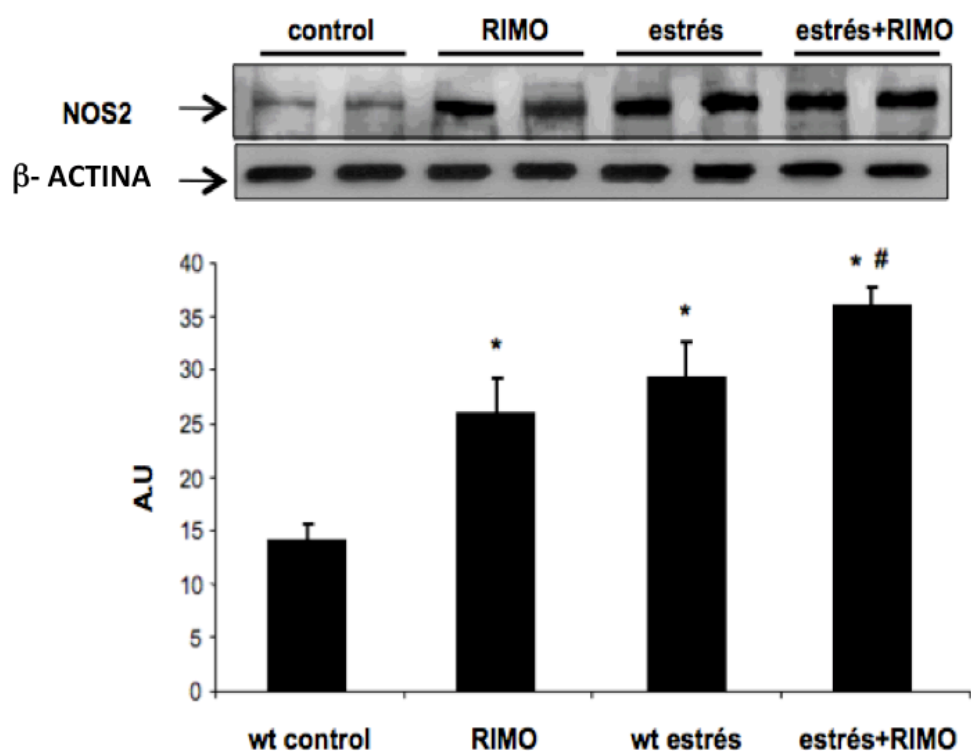


Figura 9: Expresión proteica de óxido nítrico sintasa (NOS2) (gel representativo y análisis densitométrico de $n = 3$) en el colon de ratones wt tratados con vehículo o con el antagonista farmacológico de CB1, rimonabant (3mg/kg) en condiciones basales y tras exposición a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría y se comparó para la significación estadística.

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs ratones estresados wt.

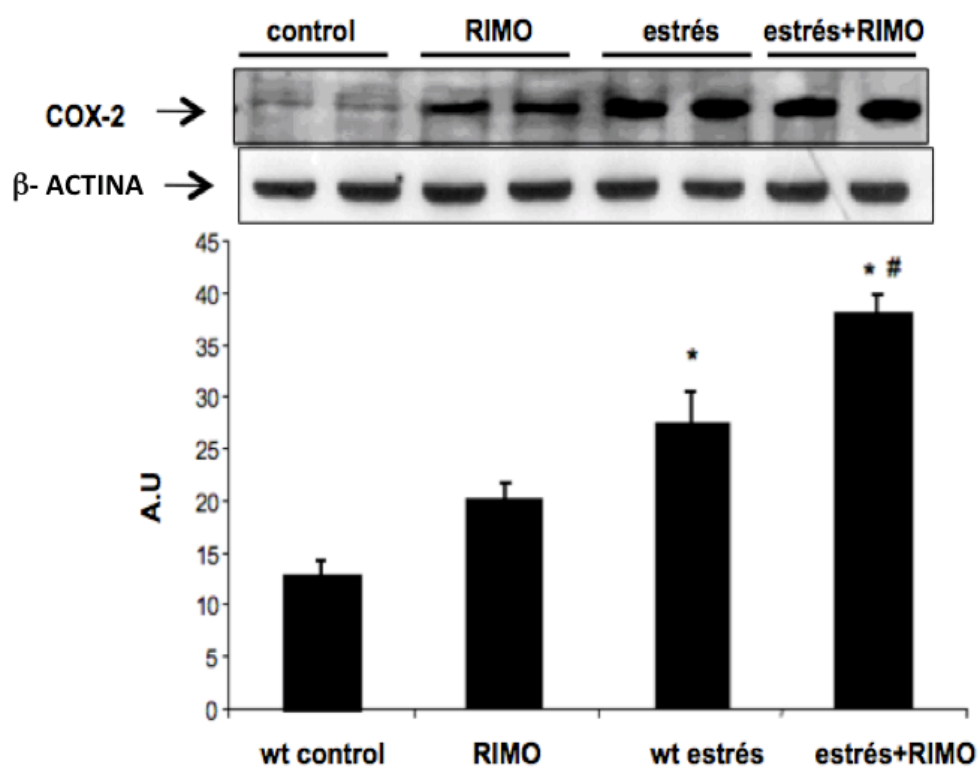


Figura 10: Expresión proteica de cicloxigenasa (COX2) (D) (gel representativo y análisis densitométrico de $n = 3$) en el colon de ratones WT tratados con vehículo o con el antagonista farmacológico de CB1, rimonabant (dosis de 3 mg/kg) en condiciones basales o tras exposición a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría y se comparó para la significación estadística.

** $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs ratones estresados wt.*

4. Papel del CB1 en la secreción cólica de IgA tras exposición al estrés

Para clarificar los posibles mecanismos homeostáticos locales implicados en la disfunción antiinflamatoria cólica post-estrés y en el paso de bacterias intestinales a los órganos intraabdominales, se realizó la medición de uno de los mecanismos de defensa mucosa más importantes, la IgA, en las muestras de colon.

El EAI indujo una reducción significativa de los niveles de producción cólica de IgA tanto en ratones WT como CB1^{-/-} (figura 11).

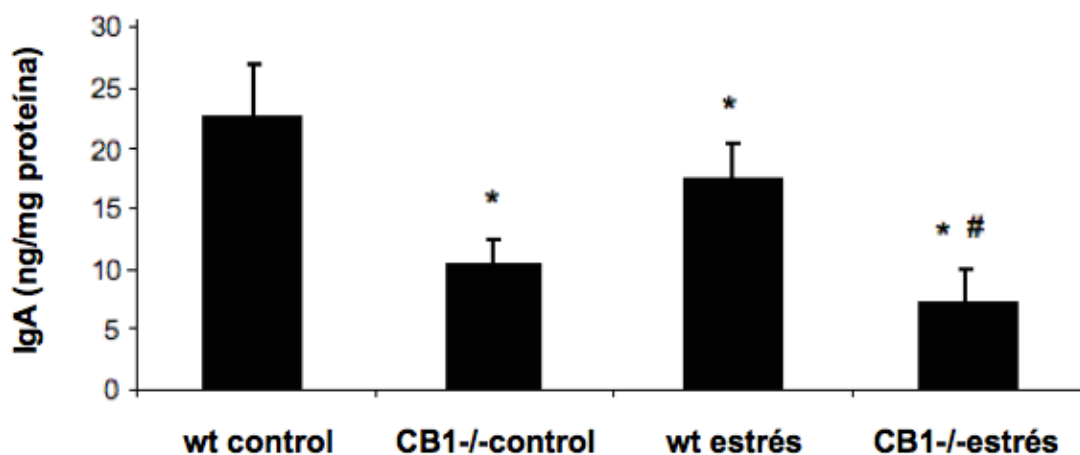


Figura 11: Niveles de inmunoglobulina A (IgA) cólica de ratones wt y CB1^{-/-} en condiciones basales y tras exposición a EAI; los datos representan las medias \pm DE de 8 ratones.

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs ratones estresados wt.

El rimonabant (3 mg/kg) no redujo los niveles de IgA ni en ratones en condiciones basales ni tras aplicar el EAI durante 4 días (**figura 12**).

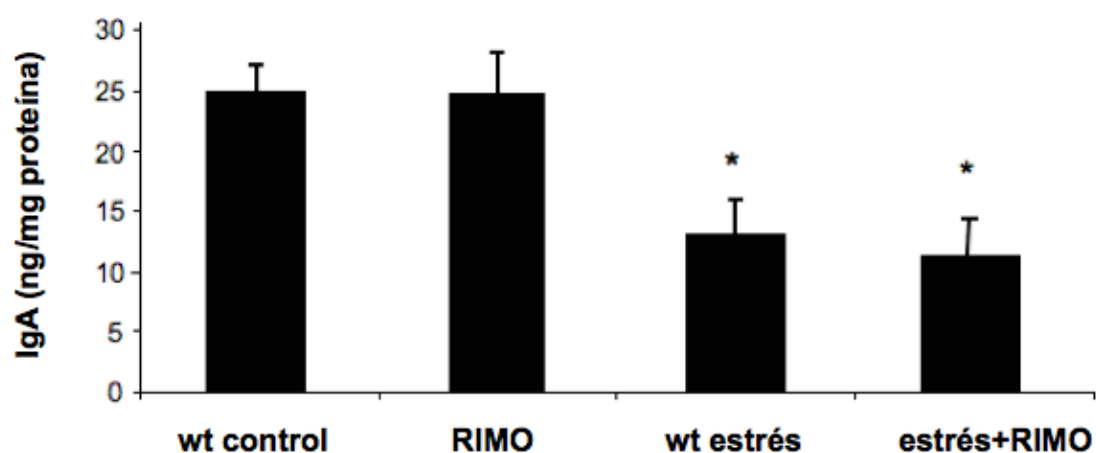


Figura 12: Niveles de inmunoglobulina A (IgA) cólica de ratones wt tratados con vehículo o el antagonista farmacológico del CB1 rimonabant (dosis de 3 mg/kg) en condiciones basales o tras exposición a EAI; los datos representan las medias \pm DE de 8 ratones.

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados.

Sin embargo el rimonabant (10 mg/kg) no redujo los niveles de IgA en el colon en los ratones en condiciones basales pero sí en los ratones estresados WT-CD1 (**figura 13**).

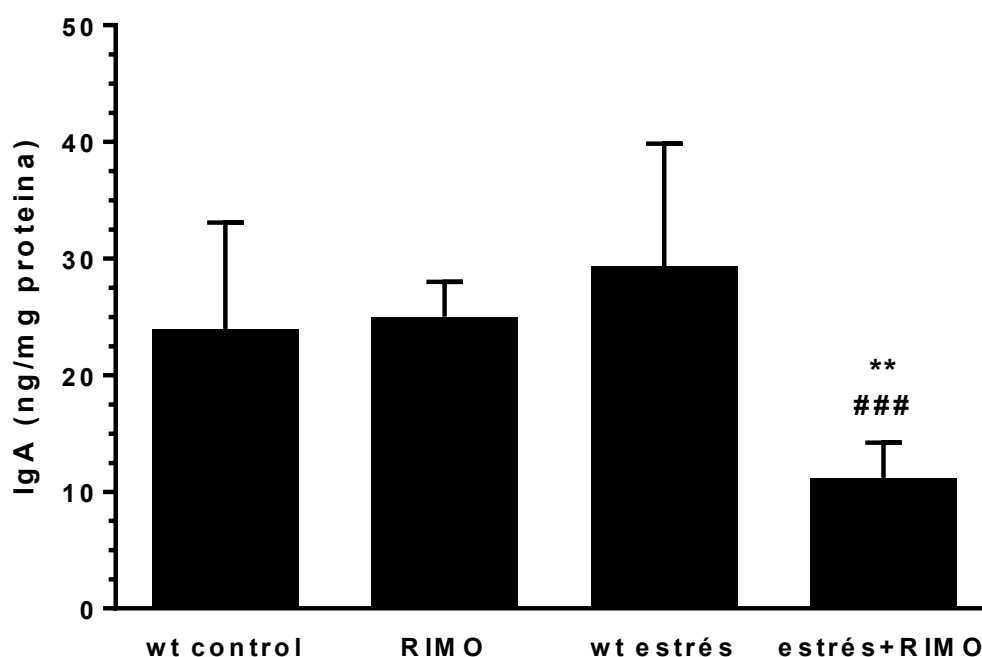


Figura 13: Niveles de inmunoglobulina A (IgA) cólica de ratones wt tratados con vehículo o el antagonista farmacológico del CB1 rimonabant (dosis de 10 mg/kg) en condiciones basales y tras exposición a EAI; los datos representan las medias \pm DE de 8-13 ratones.

**P < 0,01 vs control, animales no estresados; ### P < 0,001 vs wt control, animales no estresados

Para explorar los mecanismos implicados en la disminución de los niveles cólicos de IgA observados en los ratones CB1^{-/-}, se analizó la expresión mucosa de la quimioquina derivada de las células del epitelio intestinal CCL28³⁵², que está implicada en el reclutamiento hacia la mucosa intestinal de las células plasmáticas productoras de IgA.

El estrés indujo un marcado aumento de la expresión cólica de CCL28 sólo en los ratones CB1^{-/-} (**figura 14**).

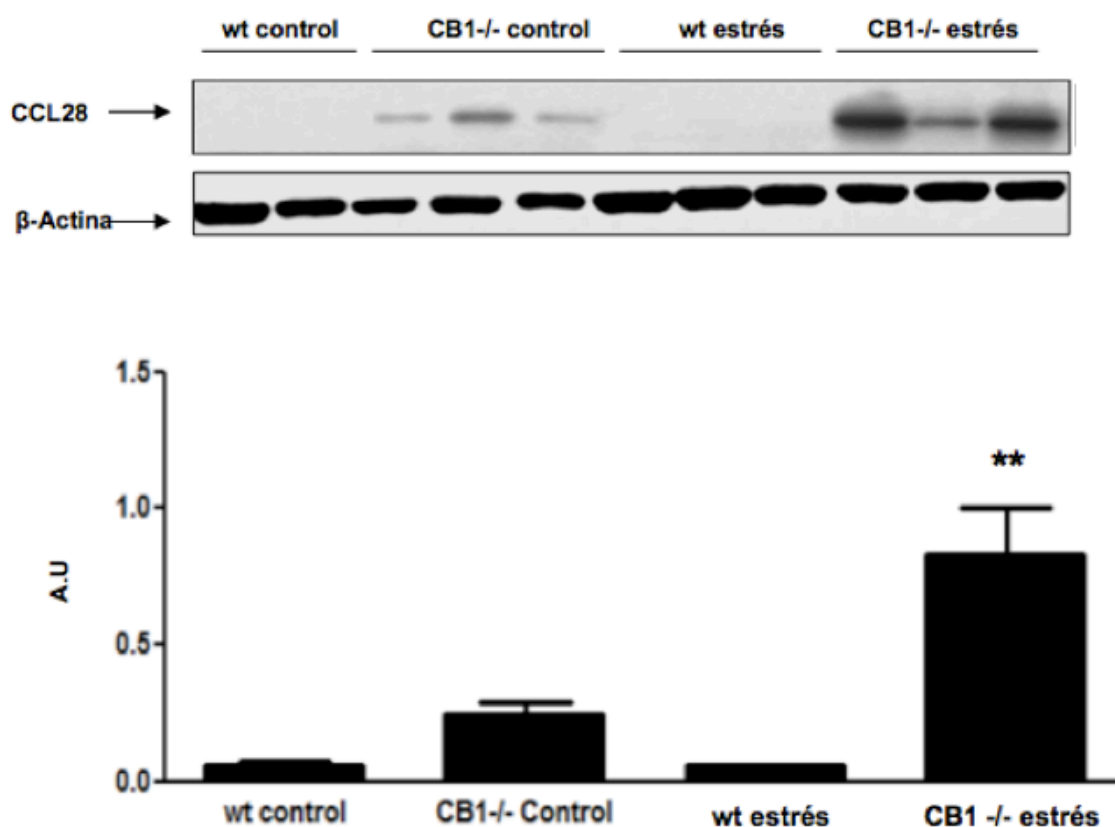


Figura 14: Expresión de la proteína CCL28 (gel representativo y análisis densitométrico de $n = 3$) en el colon de ratones wt y CB1^{-/-} en condiciones basales y tras exposición a estrés agudo y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría y se comparó para la significación estadística.

** $p < 0,01$ vs todos los grupos estudiados.

De igual forma se valoró la expresión de CCL28 en ratones WT y tratados con rimonabant a la dosis de 10 mg/kg, observando que no existieron diferencias de expresión entre ninguno de los grupos analizados (**figura 15**).

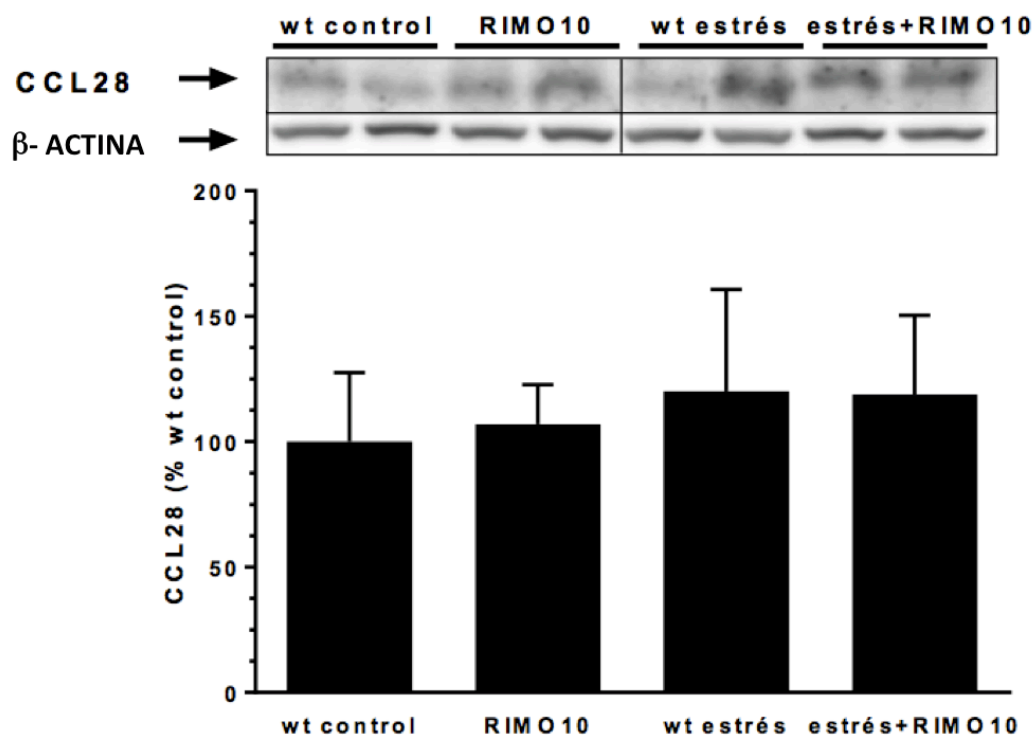


Figura 15: Expresión proteica de la quimioquina epitelial asociada a mucosa (CCL28) (gel representativo y análisis densitométrico de n = 5) en el colon de ratones WT tratados con vehículo o con el antagonista farmacológico de CB1, rimonabant a dosis de 10 mg/kg en condiciones basales o expuestos a estrés acústico y por inmovilización; la densidad media se calculó mediante densitometría y se comparó para la significación estadística.

5. Efecto del EAI sobre los niveles de corticosterona plasmática en ratones WT y CB1^{-/-}

La cuantificación por EIA de los niveles de corticosterona plasmática en el momento de la extracción sanguínea (\approx 12.00 h) mostró un aumento esperable de los mismos en todos los grupos de ratones expuestos a estrés frente a sus respectivos controles (**figura 16**), sin embargo este aumento fue superior de forma estadísticamente significativa en los ratones CB1^{-/-} frente a los animales WT.

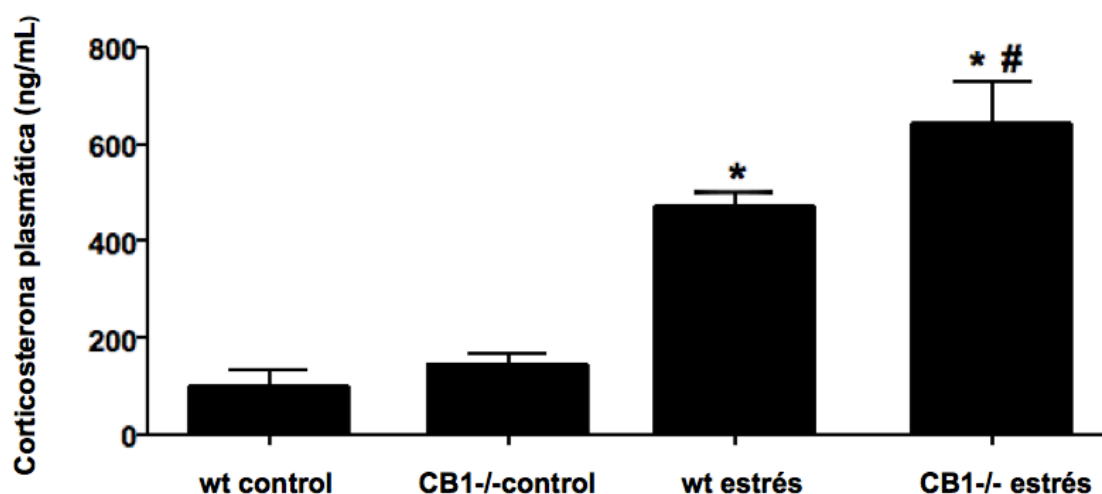


Figura 16: Niveles de corticosterona plasmática (ng/mL) en el momento de la extracción de sangre (12:00 h) de ratones wt y CB1^{-/-} en condiciones basales y tras exposición a estrés agudo y por inmovilización.

* $p < 0,05$ vs control, animales no estresados. # $p < 0,05$ vs ratones estresados wt.

Para analizar si los efectos observados sobre la función de barrera intestinal pudieran atribuirse a los niveles elevados de corticosterona en los ratones que carecían del receptor CB1, se inyectó intraperitonealmente

metirapona (MET) a dosis de 100 mg/kg a un grupo de 8 ratones CB1^{-/-} antes de cada sesión de estrés.

La dosis de MET empleada fue elegida basándose en estudios previos que demostraron que esta dosis es suficiente para bloquear la síntesis de glucocorticoides durante las 24 h siguientes a la inyección³⁵³.

De hecho, utilizando este protocolo, la MET inhibió el incremento en los niveles de corticosterona inducidos por el estrés en los ratones CB1^{-/-}: control 14,5 ± 3,3; control + MET 14,4 ± 4,2; estrés 61,2 ± 6,1, $P < 0,05$ vs. control y control + MET; estrés + MET: 26,6 ± 8,8 pg/ml, $P < 0,05$ vs. estrés.

Como se muestra en la **figura 17**, la inhibición farmacológica de la síntesis de glucocorticoides no modificó la permeabilidad cólica a ⁵¹Cr-EDTA en los ratones estresados CB1^{-/-}.

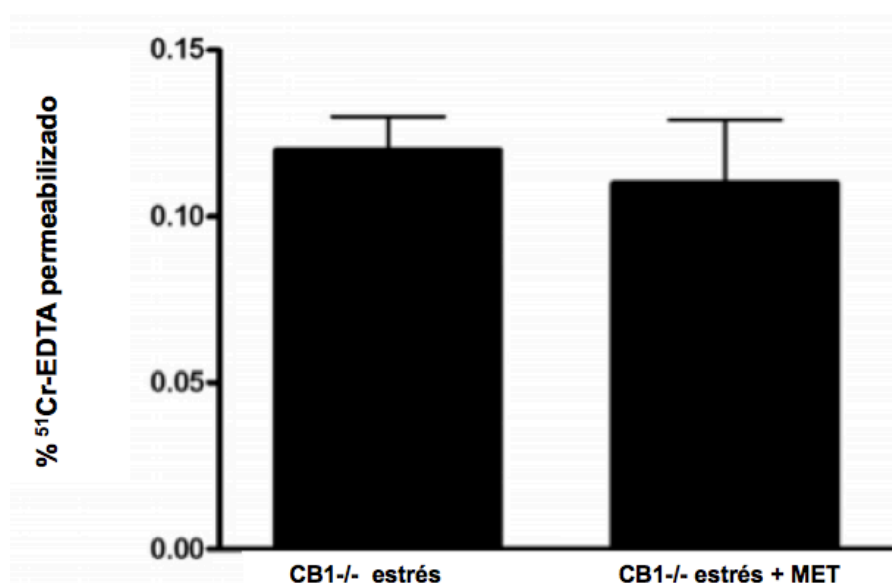


Figura 17: Permeabilidad cólica a ⁵¹Cr-EDTA (expresada como el cociente entre el ⁵¹Cr total instilado y el determinado en sangre, como porcentaje) en ratones CB1^{-/-} expuestos a EAI tratados con vehículo o con el inhibidor de la síntesis de glucocorticoides (MET) (100 mg/kg). Los datos representan las medias ± DE de 8 ratones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Discusión

Está bien establecido que la exposición a estrés experimental desencadena una respuesta inflamatoria intestinal aguda y una disfunción de la barrera intestinal que producen translocación bacteriana y un aumento de la captación de antígenos lumbinales. Estos fenómenos están asociados con una estimulación mantenida de las células inmunes de la *lamina propia* y la submucosa y, bajo ciertas circunstancias, con la inflamación crónica²²⁰.

Aparte de sus efectos sobre la función de barrera intestinal, el estrés también estimula la secreción de agua y cloro en el intestino, incrementa la liberación de mucina de las células caliciformes, inhibe el vaciamiento gástrico y la motilidad del intestino delgado, y estimula la motilidad cólica y la defecación²⁰⁴; todos estos fenómenos se asemejan a algunos de los cambios fisiopatológicos que aparecen en el SII en humanos y contribuyen a entender los mecanismos implicados en los brotes inducidos por estrés de los pacientes con EI^{354, 355}.

Siguiendo esta línea, el estrés por inmovilización repetida en roedores representa experimentalmente un modelo fácil, reproducible y ampliamente utilizado para entender aspectos fisiopatológicos de la respuesta intestinal al estrés y estudiar posibles manipulaciones farmacológicas para reducir los efectos negativos de la exposición al estrés sobre el tracto gastrointestinal³⁵⁶.

Los resultados que se presentan en esta Tesis doctoral corroboran los obtenidos previamente por nuestro grupo²³⁶ y otros grupos de investigación^{230, 245, 357}, que demuestran que las condiciones de estrés experimental inducen disfunción de la barrera intestinal, determinada por un incremento de la permeabilidad paracelular a macromoléculas, y una disminución de la secreción de IgA, lo cual se asocia a una translocación bacteriana a los GLM, el hígado y el bazo.

Existen escasos estudios que hayan estudiado el posible efecto del SEC sobre la función de barrera intestinal. Estudios *in vitro* han encontrado un efecto distinto de los cannabinoides exógenos frente a los endógenos respecto de su activación de CB1 y el efecto que consiguen sobre la barrera intestinal^{326, 339, 340}. Parece que los cannabinoides exógenos (tetrahidrocannabinol o cannabidiol) reducen la permeabilidad intestinal en las células Caco-2 mientras

que la AEA y el 2-AG aumentan la permeabilidad intestinal. Asimismo, dependiendo de si se aplican los agonistas cannabinoides a nivel apical o basocelular el efecto conseguido es distinto³⁴⁰.

Hasta el momento, sólo hay un estudio *in vivo* que valore el efecto de la activación del SEC en un modelo de ratones obesos (*ob/ob*), que encontró un aumento de la permeabilidad intestinal medida por los niveles de LPS en plasma tras la activación del receptor CB1³⁵⁸. El receptor CB2, según los datos disponibles de modelos *in vitro*, no parece estar implicado en la permeabilidad intestinal^{326, 341}.

Por tanto no queda completamente aclarado el papel del SEC sobre la función de barrera intestinal. Los resultados de la presente Tesis doctoral demuestran, tanto por un abordaje genético como farmacológico, que los animales que carecen de la señalización mediada por CB1 presentan un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias en la mucosa cólica tras la exposición al estrés. En nuestro modelo experimental el CB1 parece ejercer este papel antiinflamatorio y homeostático a través del refuerzo de la permeabilidad epitelial cólica (medida mediante la permeabilidad a ⁵¹Cr-EDTA y la translocación bacteriana cólica) y el control de la producción mucosa de IgA.

Nuestros resultados coinciden, a pesar de emplear modelos experimentales diferentes, con datos previamente publicados que mostraban que el CB1 protege contra la inflamación intestinal en dos modelos clásicos de colitis inducida químicamente³⁴.

1.- Efecto del estrés acústico y por inmovilización sobre la expresión de CB1 y las enzimas de síntesis y degradación del SEC intestinal

El EAI no indujo cambios en la expresión de CB1. Experimentos previos de diferentes grupos de trabajo con distintos modelos experimentales de inflamación intestinal han descrito un incremento de la expresión de CB1³⁵⁹,

aunque ninguno de estos grupos había empleado modelos de inflamación intestinal inducida por estrés.

Nuestros resultados respecto de los niveles de expresión de CB1 no coinciden con los encontrados en modelos previos de inflamación. Esta discordancia puede deberse a que tal vez en el modelo de inducción de inflamación intestinal inducida por estrés utilizado (EAI) el aumento de expresión de CB1 se produce en los primeros días tras el inicio del mismo. Es posible que en el día 4, que es cuando hemos realizado el sacrificio y la determinación de la expresión de niveles de CB1, dicho aumento haya vuelto a niveles basales previos a la inducción del estrés. Se sabe que el aumento de la expresión de los distintos componentes del SEC en modelos experimentales de colitis puede ser tanto tiempo- como lugar- dependiente³²⁸, lo cual puede explicar la ausencia de aumento de CB1 en el día 4 en nuestro modelo.

Nuestro grupo de investigación obtuvo resultados similares cuando estudió el papel de PPAR- γ en el mantenimiento de la homeostasis cólica tras la inflamación inducida por estrés²³⁶. En dicho estudio observamos un aumento de PPAR- γ que era máximo a las 6h de haber inducido el estrés y posteriormente, aunque se mantenía más elevado que en condiciones basales, se reducía en día 5 y día 10.

Este punto debería ser explorado en futuros estudios que valoren la determinación de niveles de expresión de CB1 en los primeros días/horas tras la inducción del estrés.

Dado que el CB2, según los datos disponibles de modelos *in vitro*, no parece estar implicado en la permeabilidad intestinal^{326, 341}, el resto de experimentos orientados a valorar la función de barrera intestinal se dirigieron únicamente a valorar el efecto del bloqueo genético o farmacológico de CB1.

En modelos previos experimentales de inflamación intestinal no se ha descrito la actividad de las enzimas de síntesis del SEC. En nuestro modelo no encontramos cambios en la expresión ni de DAGL ni de PLD-NAPE, lo cual indica que los cambios mediados por el SEC en nuestro modelo de EAI no se producen por un aumento en la síntesis de endocannabinoides.

Respecto de los datos existentes en humanos acerca de la actividad de las enzimas de síntesis del SEC en pacientes con EII los datos son muy

escasos. En un estudio realizado en pacientes con CU, en aquellos que tenían CU quiescente no se encontraron cambios en la expresión de DAGL ni de PLD-NAPE pero en aquellos que estaban en fase de actividad de la enfermedad había una reducción de la actividad de PLD-NAPE y un incremento de la de DAGL³³¹.

Otro estudio realizado en muestras de pacientes con EC y CU encontró una reducción de PLD-NAPE en la mucosa de pacientes con inflamación activa no existiendo modificaciones en los niveles de esta enzima en ninguna de las dos enfermedades cuando los pacientes estaban en fase de remisión³⁶⁰.

Respecto del análisis de la expresión de las enzimas de degradación del SEC sí se produjo en nuestros experimentos un aumento de la expresión tanto de MAGL como de FAAH.

Como enzimas responsables de la degradación de los endocannabinoides 2-AG y AEA respectivamente, la MAGL y la FAAH son elementos cruciales en la regulación por parte del SEC de la cascada inflamatoria³⁵⁹. Se ha descrito que el uso de distintos antagonistas tanto de la MAGL (JZL184²⁸⁸) como de la FAAH (PF-3845³⁶¹ y URB597³²⁹) produce un efecto antiinflamatorio en distintos modelos experimentales de colitis.

En resumen, en nuestro modelo de EAI los datos obtenidos respecto de la actividad enzimática del SEC intestinal demuestran que se favorece la degradación de los endocannabinoides sin estimular su síntesis con lo que el balance global es una regulación a la baja de la actividad endocannabinóide.

2.- Papel del CB1 en la permeabilidad paracelular cólica y la translocación bacteriana tras exposición al estrés

El modelo de estrés empleado en nuestros experimentos (EAI) indujo un incremento significativo de la permeabilidad cólica a ⁵¹Cr-EDTA tanto en ratones WT como CB1^{-/-}, aunque el grado de disfunción de la barrera intestinal asociado con el estrés fue significativamente mayor en los ratones CB1^{-/-}.

Asimismo, el EAI indujo la translocación de diferentes especies bacterianas a los GLM de ratones expuestos a estrés en comparación con los animales control.

Para estudiar los mecanismos subyacentes a este aumento de la permeabilidad intestinal inducido por el EAI en ratones con bloqueo genético o farmacológico de CB1 se determinó la expresión de la ocludina (proteína que participa de forma crucial en la función de barrera intestinal) y de NOGO-B (proteína del retículo endoplasmático también recientemente implicada en la función de barrera intestinal, según un estudio de nuestro grupo de investigación⁵⁶). En nuestros experimentos no hemos encontrado variaciones significativas en los niveles de expresión ni de ocludina ni de NOGO-B.

En estudios futuros sería de gran interés el determinar tanto la síntesis como la localización celular de ocludina y NOGO-B en nuestro mismo modelo de estrés y disfunción de barrera, así como de otras proteínas implicadas en la función de barrera intestinal (claudina o ZO-1).

Nuestros resultados, por lo tanto, sugieren un efecto protector basal del SEC mediado por CB1 sobre la función de barrera intestinal, reduciendo su permeabilidad y favoreciendo así la función defensiva intestinal frente a potenciales agresores externos, hecho que se había demostrado previamente en cerebro³⁶². Estos resultados, que no se habían descrito previamente, abren un potencial campo de investigación terapéutica sobre la modulación del SEC para el manejo de pacientes con patología intestinal inducida o agravada por el estrés, como son la EII y el SII.

El posible beneficio de los cannabinoides sobre la función epitelial en distintas partes del organismo ya había sido descrito previamente en diferentes modelos experimentales de otras enfermedades. En un modelo experimental en ratas con diabetes inducida farmacológicamente el cannabidiol redujo el aumento de la permeabilidad vascular en la retina diabética³⁶³. Por otro lado, el tratamiento con cannabidiol atenúa los efectos sobre la permeabilidad celular inducidos por niveles elevados de glucemia en un modelo de células endoteliales de arteria coronaria humana³⁶⁴. Otro estudio acerca del funcionamiento del SEC en la función de barrera hematoencefálica, que empleaba células endoteliales microvasculares de cerebro humano

cocultivadas con astrocitos humanos, describió una reducción de la permeabilidad epitelial inducida por HIV-1 tras la administración de agonistas sintéticos de CB1³⁶⁵.

En la barrera placentaria, al contrario de los escenarios arriba mencionados, el cannabidiol parece inducir un aumento de la permeabilidad de la misma a diferentes sustratos, con las implicaciones de potenciales riesgos para el feto que esto podría acarrear³⁶⁶.

Por lo tanto, de forma global (con la excepción de la barrera placentaria) la activación del SEC parece ejercer un papel protector de la homeostasis en distintos órganos y sistemas, reduciendo la permeabilidad, y por lo tanto la exposición al medio externo.

A continuación analizaré los escasos estudios publicados sobre la función del SEC en la regulación de la permeabilidad intestinal.

En primer lugar sólo hay dos estudios realizados *in vitro* en los que se haya estudiado la posible influencia de la activación del SEC y su relación con la función de barrera intestinal. Ambos estudios, realizados por el mismo grupo investigador, emplean un modelo con células Caco-2 para valorar la respuesta a la activación cannabinoide de CB1, bien mediante cannabinoides exógenos (tetrahidrocannabinol y cannabidiol) o endógenos (AEA y 2-AG)^{339, 340}.

En el primer estudio³⁴⁰ encuentran que los endocannabinoides ejercen un efecto diferente sobre la función de barrera intestinal dependiendo del lugar de la célula donde se aplican, mientras que el tetrahidrocannabinol y el cannabidiol ejerce un efecto de disminución de la permeabilidad intestinal independientemente de si se aplican en la parte apical o basocelular de la célula. Llama la atención que la activación de un mismo receptor (en este caso el CB1) medie tanto aumentos como reducciones de la permeabilidad, lo cual puede sugerir que diferentes ligandos del mismo receptor pueden producir diferentes respuestas al activar diferentes vías de señalización. De hecho los mismos autores señalan que en un estudio piloto (no publicado pero mencionado en el texto³⁴⁰) realizado en su laboratorio, los efectos del tetrahidrocannabinol y el cannabidiol parecer ser mediados por MAPK mientras que los de los endocannabinoides activan la señalización mediada por óxido nítrico (NO).

De igual forma es importante destacar que un modelo celular de epitelio intestinal, como es el empleado, está lejos de reflejar la realidad observada en situaciones fisiológicas.

El segundo estudio³³⁹, realizado también con un modelo *in vitro* por el mismo grupo de trabajo, se diferencia del previo en que intentan simular unas condiciones más fisiológicas de inflamación mediante la aplicación en la membrana basolateral de TNF- α e INF- γ , usados como inductores del aumento de la permeabilidad. En este escenario se repitió el hallazgo de la reducción de la permeabilidad mediante el empleo de tetrahidrocannabinol y cannabidiol mientras que la AEA y el 2-AG aumentaban los niveles de permeabilidad intestinal.

Sólo otro estudio ha valorado el efecto del SEC sobre la función de barrera intestinal, empleando un modelo doble (*in vivo* e *in vitro*)³²⁶. En el modelo *in vivo* estudiaron el efecto de la activación del SEC en un modelo genético de ratones obesos (*ob/ob*). En dichos ratones el empleo de un antagonista del receptor CB1 produjo un aumento de la permeabilidad intestinal medida mediante la determinación de los niveles de LPS en plasma, asociado a cambios en la distribución de proteínas de las TJ (ZO-1 y claudina). Para su modelo *in vitro* emplearon células Caco-2 en las que tras la estimulación con LPS y el empleo de un antagonista de CB1 apreciaron una normalización de la expresión de RNAm de ZO-1 y claudina, así como de la resistencia eléctrica transepitelial.

En este caso, el modelo empleado *in vivo* (ratones *ob/ob*) tal vez no sea el idóneo para valorar el funcionamiento del SEC, debido a la bien conocida relación entre la acción del SEC y su efecto bidireccional sobre el consumo de grasas³⁰⁵. Por otro lado, en su modelo *in vivo* realizan la determinación de LPS en plasma de sangre periférica, a pesar de que en análisis comparativos recientes de distintas pruebas para determinar la permeabilidad intestinal se ha destacado que la medición de LPS tiene fiabilidad como marcador de permeabilidad de la barrera intestinal si se realiza en plasma de sangre de la vena porta, estando aún así su determinación asociada a importante variabilidad³⁶⁷.

En nuestros experimentos empleamos ratones CB1^{-/-}, que son un modelo bien establecido para el estudio del SEC en modelos experimentales³⁶⁸. Por otra parte nuestro abordaje para la medición de la permeabilidad paracelular fue doble, mediante la medición de ⁵¹Cr-EDTA y de la translocación bacteriana; ambos métodos han sido utilizados previamente para la cuantificación de la permeabilidad intestinal en modelos de disfunción de barrera intestinal en roedores expuestos a estrés²³⁶. El ⁵¹Cr-EDTA es un excelente marcador de permeabilidad intestinal al no ser degradado por la acción de las bacterias intestinales y tener una vía de paso paracelular^{369, 370}.

En resumen, aunque nuestros resultados no coinciden con algunos de los estudios previos (ninguno de los cuales emplea nuestro modelo experimental de disfunción de barrera intestinal inducida por estrés), creemos que la robustez tanto del modelo genético defectivo empleado con su corroboración farmacológica, como de los análisis de permeabilidad de barrera utilizados, permiten afirmar que el CB1 ejerce un efecto protector sobre la función de barrera intestinal, no mediado por ocludina ni por NOGO-B.

3.- Papel del CB1 en la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon tras la exposición a estrés.

El papel de la enzima proinflamatoria NOS2 en la inflamación mucosa inducida por estrés y en la disfunción de barrera ya ha sido descrito previamente. El NO producido por la activación de la NOS2 aumenta la permeabilidad intestinal tanto *in vitro*³⁷¹ como *in vivo*³⁷² mediante un efecto que parece relacionado con el reordenamiento del citoesqueleto y la subsiguiente disfunción de las TJ.

En este sentido, el aumento de la permeabilidad cólica secundario al estrés agudo se ha relacionado recientemente con una disminución de ZO-2 y del RNAm de la ocludina²³³, aunque nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de ocludina medida por Western blot. Habría que explorar en futuros estudios la expresión de otras proteínas, como la claudina o

la ZO-1, que forman parte de las TJ y que se han visto alteradas en otros modelos de disfunción epitelial intestinal relacionada con el sistema cannabinoide³²⁶.

Por lo tanto, el NO producido por la NOS2 se postula como un buen candidato para mediar la disfunción de barrera inducida por estrés descrita en los animales WT y, en mayor medida, en los ratones CB1^{-/-}.

De hecho, estudios previos han demostrado que el Δ^9 -THC atenúa la expresión y actividad de NOS2 en macrófagos, en un proceso mediado a través de la inhibición CB2 dependiente de la capacidad de unión del factor de transcripción NF- κ B³⁷³; resultados similares se han descrito por otros investigadores usando agonistas específicos de CB1 en células de glioma de ratas³⁷⁴. Estos datos apoyan nuestros resultados, que sugieren de forma indirecta que la activación de CB1 reduce la expresión de NOS2 en la mucosa cólica.

Pero, por otro lado, el aumento de la permeabilidad intestinal y la subsiguiente translocación bacteriana a la *lamina propria* podrían causar la activación de la expresión de estas enzimas tanto en las células epiteliales intestinales como en los macrófagos, en un proceso mediado fundamentalmente por receptores de reconocimiento de patrones moleculares microbianos (*pattern recognition receptors*)^{375 376, 377} a través de la activación del NF- κ B.

Por tanto, no queda del todo claro si el incremento de la expresión mucosa de NOS2 observado en nuestro modelo es causa o consecuencia (o ambos a la vez) del aumento de la permeabilidad epitelial en los ratones estresados CB1^{-/-}, por lo que serán necesarias investigaciones futuras que aclaren este aspecto.

4.- Papel del CB1 en la secreción cólica de IgA tras exposición al estrés

Nuestros resultados muestran que la delección genética del CB1 no sólo induce mecanismos proinflamatorios en el colon, sino que también reduce la producción de moléculas con función homeostática como la IgA. La IgA secretada representa una primera línea defensiva de las superficies mucosas frente a los patógenos, mediante su capacidad de neutralizar virus, unirse a toxinas y antígenos alimentarios y aglutinar bacterias, evitando que se unan a las células del epitelio intestinal³⁷⁸. Por lo tanto, la reducción significativa en los niveles de IgA medidos en la luz del colon que se observa en mayor grado en los ratones estresados CB1^{-/-} podría contribuir, junto al incremento de la permeabilidad paracelular cólica, a la translocación bacteriana a los GLM, el hígado y el bazo.

Sin embargo, no hemos reproducido este efecto empleando un bloqueo farmacológico del CB1 con una dosis de rimonabant de 3 mg/kg, aunque sí con dosis de 10 mg/kg. La ausencia de efecto de rimonabant en este escenario a las dosis de 3 mg/kg pudiera deberse a que éstas hayan sido insuficientes para conseguir este efecto. En diversos estudios previos se observan efectos de rimonabant que son dosis dependientes³⁷⁹.

En un intento de explorar los mecanismos de la producción de IgA mediada por CB1 se analizó en homogeneizados de colon la expresión de la quimioquina epitelial CCL28 implicada en el reclutamiento de células plasmáticas a la *lamina propria*^{352, 380}. El protocolo de estrés usado en nuestro estudio indujo un marcado incremento de la expresión cólica de CCL28 únicamente en los ratones CB1^{-/-}, sin encontrar diferencias significativas en dicha expresión en los animales tratados con rimonabant a dosis de 10 mg/kg. Este resultado parece bastante lógico dado que la expresión de CCL28 en el epitelio cólico se regula, al menos parcialmente, por el factor de transcripción NF-κB³⁵², al igual que la expresión mucosa de NOS2 y COX2.

Por consiguiente, el que la disminución de los niveles de IgA en la mucosa cólica sea debida a mecanismos adicionales tales como una disminución de la síntesis de IgA por las células plasmáticas de la *lamina propria* o a que se altere su transporte a la luz cólica debido, por ejemplo, a una disminución de la expresión del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (Rplg), son aspectos que deberán ser estudiados en el futuro.

Estudios previos del grupo de trabajo en el que se ha desarrollado la investigación de este estudio demostraron un papel protector análogo del receptor activado de proliferación de peroxisomas- γ (PPAR- γ) en la mucosa cólica de ratas expuestas a estrés por inmovilización; en dichos experimentos la activación farmacológica del PPAR- γ abolía la inflamación mucosa, la disfunción de barrera y la reducción de los niveles de IgA inducidos por el estrés experimental²³⁶. Aunque el PPAR- γ está implicado fundamentalmente en la diferenciación de adipocitos y en la homeostasis de la glucosa, durante los últimos años se han descubierto sus propiedades antiinflamatorias a distintos niveles del organismo; de hecho se están desarrollando análogos del mismo para tratar la CU³⁸¹. Además existen ciertas similitudes funcionales entre los efectos mediados por PPAR y por la activación de los receptores cannabinoides; se ha descrito que ciertos cannabinoides naturales y sintéticos se unen al dominio de unión a ligandos del PPAR- γ y lo activan^{382, 383}, y los principales endocannabinoides - la AEA y el 2-AG - y también el ácido ajulémico, un análogo estructural del tetrahidrocannabinol, tienen propiedades antiinflamatorias mediadas por PPAR- γ ³⁸⁴. Otros autores han propuesto mecanismos alternativos por los cuales los cannabinoides pueden producir la activación de PPAR. Por ejemplo, la unión del CB1 podría estimular la vía de las MAPK³⁸⁵, que regulan la actividad transcripcional del PPAR- γ por fosforilación directa³⁸⁶.

5.- Efecto del estrés acústico y por inmovilización sobre los niveles de corticosterona plasmática en ratones WT y CB1^{-/-}

Algunos estudios han encontrado una alteración en la actividad basal y tras exposición a estrés del eje HAA en ratones *knock out* para CB1³⁸⁷. En el estudio actual las respuestas basales no cambian, pero la respuesta al estrés es mayor en los ratones CB1 *knock out* que en los ratones WT, lo que apoya un papel homeostático del CB1 en condiciones de exposición al estrés, tal y como se ha demostrado por investigadores de nuestro grupo de trabajo que sucede en el cerebro³⁴⁶.

En nuestro modelo experimental, hemos encontrado que los ratones CB1^{-/-} expuestos a estrés presentaban unos mayores niveles de corticosterona plasmática respecto de los controles expuestos a estrés, lo cual obligaba a descartar que esta elevación de la corticosterona tuviera un efecto directo sobre el aumento de la permeabilidad intestinal, independiente del propio efecto mediado por la ausencia de CB1.

De hecho en estudios recientes se sugiere que la corticosterona, como mediador de estrés crónico psicológico, induce una disfunción de la barrera epitelial cólica mediante la regulación a la baja de las proteínas de las TJ responsables de controlar el paso paracelular de moléculas³⁸⁸, aumentando la permeabilidad para las macromoléculas.

Nuestros resultados muestran que la inhibición farmacológica de la síntesis de glucocorticoides con MET no modificó de forma relevante la permeabilidad cólica a ⁵¹Cr-EDTA en ratones CB1^{-/-} estresados.

Se ha descrito que la MET, al producir el bloqueo periférico en la síntesis de corticoides produce un aumento secundario de los niveles de ACTH y CRF³⁸⁹. De hecho, en dicho estudio los niveles descritos de CRF 3 horas después de la inyección de MET son un 231% superiores respecto de los basales pre-administración.

Por lo tanto, es lógico plantear que tras el bloqueo experimental con MET se haya producido un aumento secundario de los niveles de CRF circulante (nosotros no realizamos una determinación de los mismos en nuestros experimentos, pero sí de los de corticosterona plasmática).

El CRF se considera actualmente un elemento pivotal en la regulación de la permeabilidad intestinal en situaciones de estrés, tanto por su efecto directo sobre el epitelio intestinal como por su acción formando parte del eje CRF-mastocito²²¹.

Por lo tanto, sería esperable un posible aumento de la permeabilidad en los ratones CB1^{-/-} tratados con MET secundario al aumento de CRF circulante tras la administración de la misma; pero este hecho no se produjo en nuestros experimentos. La ausencia de un incremento de la permeabilidad intestinal tras la administración de MET parece indicar que los ratones CB1^{-/-} activan algún sistema endógeno para contrarrestar la acción del CRF sobre el aumento de la

permeabilidad intestinal o bien que la señalización intestinal de CRF en condiciones de estrés se sirve de CB1 para ejercer su efecto sobre la permeabilidad intestinal, por lo que en nuestras condiciones experimentales este efecto no podría producirse.

Esta posible interacción funcional entre el SEC y el CRF se ha descrito previamente en un modelo experimental en ratas en las que el empleo de un antagonista de CB1 (AM251) produjo el bloqueo de un comportamiento de sensibilización a la cocaína inducido por CRF, lo que sugiere la existencia de interacciones funcionales entre el SEC y el CRF³⁹⁰. Sería necesario, por tanto, realizar investigaciones sobre la posible interacción de CB1 y CRF a nivel intestinal para aclarar este punto.

6.- Implicaciones clínicas e ideas de futuro

La disfunción de la barrera intestinal es un acontecimiento crucial en diversas enfermedades digestivas y sistémicas, tales como la enfermedad celíaca, la EII, diversas alergias alimentarias, la cirrosis hepática, la pancreatitis aguda, la sepsis y los grandes quemados y está implicada en su curso clínico y algunas de sus graves complicaciones^{1, 391}. También se ha propuesto que la función de barrera alterada está implicada en la hipersensibilidad visceral observada en modelos animales de estrés que caracterizan el SII postinfeccioso en humanos^{392, 393}. La activación del CB1 lleva a la inhibición de las vías colinérgicas excitadoras, inhibiendo secundariamente la motilidad del intestino delgado y grueso, y su papel en la nocicepción visceral del intestino ya ha sido propuesto³⁹⁴. Estos efectos constituyen la base racional para plantear el empleo de los cannabinoides en los pacientes con SII³⁹⁵.

Los efectos de la activación del CB1 en la función de barrera intestinal que describimos en este estudio representan un nuevo hallazgo que sugiere que la acción sobre el CB1 pudiera ser una estrategia terapéutica atractiva frente a diferentes enfermedades relacionadas con la exposición al estrés.

Los resultados obtenidos hasta ahora con el empleo de moduladores del SEC para el tratamiento del SII o de la EII no han alcanzado el objetivo de

encontrar un fármaco que consiga un beneficio clínico claro con un perfil de seguridad razonable en dichos escenarios. El fármaco ideal modulador cannabinoide, para los pacientes con SII-D, debería tener un efecto enlentecedor del tránsito intestinal, probablemente antisecretor y con una reducción asociada de la nocicepción, todo ello intentando evitar los efectos sobre el SNC que son responsables de gran parte de la toxicidad relacionada con los tratamientos moduladores cannabinoides empleados hasta ahora.

Hay que destacar la reciente tragedia ocurrida en Francia en un ensayo clínico fase 1 con el empleo de un inhibidor de la FAAH (BIA 10-2474) y en el que falleció un voluntario sano y otros 4 tuvieron graves efectos secundarios neurológicos³⁹⁶. El mecanismo último causante de la toxicidad neurológica aún no se conoce, aunque las investigaciones posteriores y los estudios con otros inhibidores de la FAAH hacen que sea muy poco probable que se tratara de un efecto de clase.

En distintos modelos animales se ha probado que la activación de CB1 reduce el tránsito intestinal al disminuir la contractilidad del músculo liso, mediante la disminución de la liberación de ACh³⁹⁴. Diferentes agonistas de CB1 (nabilona, AEA, y Δ^9 -THC) han demostrado este efecto, que posteriormente se ha contrarrestado con el empleo de rimonabant³⁹⁷. Un nuevo agonista de CB1 y CB2 de síntesis (AM841) ha demostrado reducir la motilidad intestinal en ratas por su efecto dependiente de CB1; la dosis de AM841 que conseguía reducir la motilidad intestinal no producía efectos centrales como la sedación o la euforia, al contrario de lo que sucede con otros agonistas CB1, lo que hace que sea una de las moléculas con mayor potencial para su posible aplicabilidad futura en la clínica^{398, 399}. Por su parte, el empleo de un agonista de CB2 (JWH-133) no tuvo efecto sobre los tiempos de tránsito basales, pero sí los reducía tras la inducción inflamatoria inducida por LPS⁴⁰⁰.

Otras estrategias farmacológicas como la inhibición de las enzimas de degradación de los endocannabinoides (la FAAH entre otras) también han demostrado aumentar el tiempo de tránsito intestinal asociado a un aumento de los niveles de AEA²⁸².

La experiencia en humanos con SII empleando moduladores cannabinoides es escasa. En un ensayo doble ciego, aleatorizado, controlado

con placebo, en pacientes con SII-D, SII-E o SII-A, tratados con una dosis única de dronabinol (agonista no selectivo de los receptores cannabinoides), los autores encontraron que la utilización del fármaco produjo una reducción de la motilidad cólica y un aumento de la distensibilidad del mismo, aunque no modificó ni la sensibilidad ni el tono cólico²⁹⁷. Se subanalizaron los pacientes en función de variantes genéticas que codificaban para la FAAH, apreciando que diversas variantes podrían influir en la respuesta al dronabinol, aunque el escaso tamaño muestral hace que sólo pueda ser tomado como una hipótesis para futuros estudios.

En los pacientes con EII el fármaco modulador endocannabinoide deseable debería tener propiedades antiinflamatorias –fundamentalmente–, con efecto antisecretor intestinal, analgésico y antiemético y estimulante del apetito, para intentar contrarrestar la mayor parte de los signos y síntomas que aparecen en estas enfermedades. Todo ello, con nula o mínima asociación a efectos adversos centrales cannabinoides. En diversos modelos animales de inflamación y diarrea, los agonistas tanto de CB1 como de CB2 aumentaron el tiempo de tránsito intestinal, redujeron la diarrea y el edema de colon y disminuyeron los índices de inflamación valorados por escalas histológicas, preservando la arquitectura celular y la invasión neutrofílica^{34, 327, 401}.

Los datos en humanos son escasos, y no concluyentes respecto del potencial beneficio del tratamiento cannabinoide, tanto en EC como en CU^{332, 333}. Sería, por tanto, prematuro el afirmar que la aproximación farmacológica moduladora del sistema cannabinoide tiene ya un papel dentro del arsenal terapéutico de la EII. Son necesarios más estudios bien diseñados en poblaciones de pacientes bien caracterizadas para poder responder a esta pregunta.

Mientras tanto, seguiremos viendo en nuestras consultas pacientes con EII que nos comentan que encuentran alivio con el uso de cannabis o derivados, y nos preguntan sobre nuestra opinión al respecto.

Conclusiones

Las principales conclusiones de esta Tesis doctoral son:

- 1.- El estrés agudo y por inmovilización no aumenta la expresión de CB1 pero sí induce un incremento de la expresión de las enzimas de degradación del sistema endocannabinoide intestinal sin alterar la expresión de las enzimas de síntesis de dicho sistema.
- 2.- Los ratones que carecen mediante manipulación genética de la vía de señalización mediada por CB1 muestran un incremento de la permeabilidad epitelial paracelular cólica y de la translocación bacteriana tras exposición al estrés que no está mediado por ocludina ni por NOGO-B.
- 3.- La ausencia de señalización vía CB1 a través de un modelo genético y farmacológico produce un aumento de la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon tras exposición al estrés.
- 4.- El bloqueo genético y farmacológico del CB1 disminuye la producción cólica de IgA no mediado por CCL28.
- 5.- La inhibición farmacológica de la síntesis de glucocorticoides no afectó a la permeabilidad cólica en ratones estresados CB1^{-/-}, lo que sugiere que el aumento de la permeabilidad cólica observada se debe a otros factores distintos de la elevación de los niveles de corticosterona.

Bibliografía

1. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:799-809.
2. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008;8:411-20.
3. Helander HF, Fandriks L. Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand J Gastroenterol* 2014;49:681-9.
4. Caricilli AM, Castoldi A, Camara NO. Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5:18-32.
5. Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011;32:256-64.
6. Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, et al. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2015;107:686-96.
7. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, et al. PASSCLAIM--gut health and immunity. *Eur J Nutr* 2004;43 Suppl 2:II118-II173.
8. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014;14:189.
9. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016.
10. Husebye E. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy* 2005;51 Suppl 1:1-22.
11. Qin X, Caputo FJ, Xu DZ, et al. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function. *Shock* 2008;29:372-6.
12. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006;131:117-29.
13. Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 2014;260:8-20.

14. Antoni L, Nuding S, Weller D, et al. Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *J Crohns Colitis* 2013;7:e652-64.
15. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:356-68.
16. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 2005;54:1802-9.
17. Nakamura K, Sakuragi N, Takakuwa A, et al. Paneth cell alpha-defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci Microbiota Food Health* 2016;35:57-67.
18. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009;136:65-80.
19. Tappenden KA, Deutsch AS. The physiological relevance of the intestinal microbiota--contributions to human health. *J Am Coll Nutr* 2007;26:679S-83S.
20. Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 2000;105:1493-9.
21. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.
22. Zaph C, Du Y, Saenz SA, et al. Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *J Exp Med* 2008;205:2191-8.
23. Ramiro-Puig E, Perez-Cano FJ, Castellote C, et al. [The bowel: a key component of the immune system]. *Rev Esp Enferm Dig* 2008;100:29-34.
24. Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 2008;28:740-50.
25. Ohno H. Intestinal M cells. *J Biochem* 2016;159:151-60.
26. Miller H, Zhang J, Kuolee R, et al. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J Gastroenterol* 2007;13:1477-86.
27. Gill N, Wlodarska M, Finlay BB. Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection. *Cell Microbiol* 2011;13:660-9.
28. Roulis M, Flavell RA. Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation* 2016;92:116-131.

29. Goke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* 1998;274:G809-18.
30. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000;81:87-96.
31. Ruhl A. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 2005;17:777-90.
32. Flemstrom G, Sjoblom M. Epithelial cells and their neighbors. II. New perspectives on efferent signaling between brain, neuroendocrine cells, and gut epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G377-80.
33. Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte-Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair. *Gastroenterology* 2016;151:616-32.
34. Massa F, Marsicano G, Hermann H, et al. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest* 2004;113:1202-9.
35. Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, et al. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 1998;60:161-77.
36. Watson CJ, Rowland M, Warhurst G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C388-97.
37. Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, et al. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell* 2010;21:1200-13.
38. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 1998;141:397-408.
39. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1669:34-42.
40. Rao R. Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:62-8.

41. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 13):2363-74.
42. Khounlotham M, Kim W, Peatman E, et al. Compromised intestinal epithelial barrier induces adaptive immune compensation that protects from colitis. *Immunity* 2012;37:563-73.
43. Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007;204:3067-76.
44. Coyne CB, Bergelson JM. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:869-82.
45. Pazirandeh A, Sultana T, Mirza M, et al. Multiple phenotypes in adult mice following inactivation of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (Car) gene. *PLoS One* 2011;6:e20203.
46. Morton PE, Hicks A, Nastos T, et al. CAR regulates epithelial cell junction stability through control of E-cadherin trafficking. *Sci Rep* 2013;3:2889.
47. Paris L, Tonutti L, Vannini C, et al. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:646-59.
48. Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 2006;248:261-98.
49. Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J* 2002;16:1835-7.
50. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:660-9.
51. Ivanov AI, Naydenov NG. Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;303:27-99.
52. Schneider MR, Dahlhoff M, Horst D, et al. A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. *PLoS One* 2010;5:e14325.

53. Smalley-Freed WG, Efimov A, Burnett PE, et al. p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice. *J Clin Invest* 2010;120:1824-35.
54. Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002899.
55. Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am J Pathol* 2010;177:512-24.
56. Rodriguez-Feo JA, Puerto M, Fernandez-Mena C, et al. A new role for reticulon-4B/NOGO-B in the intestinal epithelial barrier function and inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015;308:G981-93.
57. Green KJ, Simpson CL. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 2007;127:2499-515.
58. Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y, et al. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest* 2005;115:2702-15.
59. Su L, Shen L, Clayburgh DR, et al. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 2009;136:551-63.
60. Su L, Nalle SC, Shen L, et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* 2013;145:407-15.
61. Madsen KL, Malfair D, Gray D, et al. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:262-70.
62. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, et al. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;341:1437-9.
63. D'Inca R, Di Leo V, Corrao G, et al. Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2956-60.
64. Borody TJ, Warren EF, Leis S, et al. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:42-7.

65. Summers RW, Elliott DE, Qadir K, et al. Trichuris suis seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2034-41.
66. Suenaeert P, Bulteel V, Lemmens L, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2000-4.
67. Scheinin T, Butler DM, Salway F, et al. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;133:38-43.
68. Johansson JE, Ekman T. Gut toxicity during hemopoietic stem cell transplantation may predict acute graft-versus-host disease severity in patients. *Dig Dis Sci* 2007;52:2340-5.
69. Brown GR, Lindberg G, Meddings J, et al. Tumor necrosis factor inhibitor ameliorates murine intestinal graft-versus-host disease. *Gastroenterology* 1999;116:593-601.
70. Heidt PJ, Vossen JM. Experimental and clinical gnotobiotics: influence of the microflora on graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Med* 1992;23:161-73.
71. Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, et al. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 1999;93:3267-75.
72. Bosi E, Molteni L, Radaelli MG, et al. Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2006;49:2824-7.
73. Meddings JB, Jarand J, Urbanski SJ, et al. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol* 1999;276:G951-7.
74. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008;455:1109-13.

75. Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, et al. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunol Today* 1993;14:193-6.
76. Sharpstone D, Neild P, Crane R, et al. Small intestinal transit, absorption, and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea. *Gut* 1999;45:70-6.
77. Keating J, Bjarnason I, Somasundaram S, et al. Intestinal absorptive capacity, intestinal permeability and jejunal histology in HIV and their relation to diarrhoea. *Gut* 1995;37:623-9.
78. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006;12:1365-71.
79. Eppler HJ, Schneider T, Troeger H, et al. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut* 2009;58:220-7.
80. Doig CJ, Sutherland LR, Sandham JD, et al. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:444-51.
81. Fink MP, Antonsson JB, Wang HL, et al. Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor. *Arch Surg* 1991;126:211-8.
82. Deitch EA, Morrison J, Berg R, et al. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. *Crit Care Med* 1990;18:529-36.
83. Yoseph BP, Klingensmith NJ, Liang Z, et al. Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis. *Shock* 2016;46:52-9.
84. Earley ZM, Akhtar S, Green SJ, et al. Burn Injury Alters the Intestinal Microbiome and Increases Gut Permeability and Bacterial Translocation. *PLoS One* 2015;10:e0129996.
85. Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, et al. Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1288-94.

86. Marshall JK, Thabane M, Garg AX, et al. Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1317-22.
87. Smecuol E, Bai JC, Vazquez H, et al. Gastrointestinal permeability in celiac disease. *Gastroenterology* 1997;112:1129-36.
88. van Elburg RM, Uil JJ, Mulder CJ, et al. Intestinal permeability in patients with coeliac disease and relatives of patients with coeliac disease. *Gut* 1993;34:354-7.
89. Natividad JM, Huang X, Slack E, et al. Host responses to intestinal microbial antigens in gluten-sensitive mice. *PLoS One* 2009;4:e6472.
90. Verdu EF, Huang X, Natividad J, et al. Gliadin-dependent neuromuscular and epithelial secretory responses in gluten-sensitive HLA-DQ8 transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G217-25.
91. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:1075-83.
92. de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, et al. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:418-24.
93. Pike MG, Heddle RJ, Boulton P, et al. Increased intestinal permeability in atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1986;86:101-4.
94. Jackson PG, Lessof MH, Baker RW, et al. Intestinal permeability in patients with eczema and food allergy. *Lancet* 1981;1:1285-6.
95. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, et al. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg* 1999;3:252-62.
96. Foitzik T, Fernandez-del Castillo C, Ferraro MJ, et al. Pathogenesis and prevention of early pancreatic infection in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg* 1995;222:179-85.
97. Ryan CM, Schmidt J, Lewandrowski K, et al. Gut macromolecular permeability in pancreatitis correlates with severity of disease in rats. *Gastroenterology* 1993;104:890-5.

98. Foitzik T, Stufler M, Hotz HG, et al. Glutamine stabilizes intestinal permeability and reduces pancreatic infection in acute experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 1997;1:40-6; discussion 46-7.
99. Salat-Foix D, Tran K, Ranawaya R, et al. Increased intestinal permeability and Parkinson disease patients: chicken or egg? *Can J Neurol Sci* 2012;39:185-8.
100. Davies KN, King D, Billington D, et al. Intestinal permeability and oro-caecal transit time in elderly patients with Parkinson's disease. *Postgrad Med J* 1996;72:164-7.
101. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* 2011;6:e28032.
102. Kelly LP, Carvey PM, Keshavarzian A, et al. Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014;29:999-1009.
103. Goebel A, Buhner S, Schedel R, et al. Altered intestinal permeability in patients with primary fibromyalgia and in patients with complex regional pain syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1223-7.
104. Pimentel M, Wallace D, Hallegua D, et al. A link between irritable bowel syndrome and fibromyalgia may be related to findings on lactulose breath testing. *Ann Rheum Dis* 2004;63:450-2.
105. Julio-Pieper M, Bravo JA, Aliaga E, et al. Review article: intestinal barrier dysfunction and central nervous system disorders--a controversial association. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40:1187-201.
106. Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, et al. Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflammation* 2011;8:151.
107. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 2015;48:186-94.
108. Hijazi Z, Molla AM, Al-Habashi H, et al. Intestinal permeability is increased in bronchial asthma. *Arch Dis Child* 2004;89:227-9.

109. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002;3:715-20.
110. Yacyshyn B, Meddings J, Sadowski D, et al. Multiple sclerosis patients have peripheral blood CD45RO+ B cells and increased intestinal permeability. *Dig Dis Sci* 1996;41:2493-8.
111. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108 Suppl 1:4615-22.
112. Martinez-Gonzalez O, Cantero-Hinojosa J, Paule-Sastre P, et al. Intestinal permeability in patients with ankylosing spondylitis and their healthy relatives. *Br J Rheumatol* 1994;33:644-7.
113. Morris AJ, Howden CW, Robertson C, et al. Increased intestinal permeability in ankylosing spondylitis--primary lesion or drug effect? *Gut* 1991;32:1470-2.
114. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994;180:2359-64.
115. Wu HJ, Ivanov II, Darce J, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010;32:815-27.
116. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-11.
117. Farhadi A, Gundlapalli S, Shaikh M, et al. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2008;28:1026-33.
118. Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:1340-7.
119. Bergheim I, Weber S, Vos M, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol* 2008;48:983-92.

120. Keshavarzian A, Holmes EW, Patel M, et al. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage. *Am J Gastroenterol* 1999;94:200-7.
121. Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Dig Liver Dis* 2011;43:431-8.
122. Brandtzaeg P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. *Eur J Pharmacol* 2011;668 Suppl 1:S16-32.
123. Hering NA, Fromm M, Schulzke JD. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* 2012;590:1035-44.
124. Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:379-83.
125. Wyatt J, Oberhuber G, Pongratz S, et al. Increased gastric and intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1891-6.
126. Vivinus-Nebot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 2014;63:744-52.
127. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:61-72.
128. Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1163-9.
129. Teshima CW, Dieleman LA, Meddings JB. Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1258:159-65.
130. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:307-17.
131. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, et al. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986;105:883-5.

132. May GR, Sutherland LR, Meddings JB. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 1993;104:1627-32.
133. Munkholm P, Langholz E, Hollander D, et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut* 1994;35:68-72.
134. Peeters M, Geypens B, Claus D, et al. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:802-7.
135. Fries W, Renda MC, Lo Presti MA, et al. Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2730-6.
136. D'Inca R, Annese V, di Leo V, et al. Increased intestinal permeability and NOD2 variants in familial and sporadic Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1455-61.
137. Buhner S, Buning C, Genschel J, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;55:342-7.
138. Kevans D, Turpin W, Madsen K, et al. Determinants of intestinal permeability in healthy first-degree relatives of individuals with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:879-87.
139. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, et al. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1165-79.
140. Chichlowski M, Hale LP. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1139-49.
141. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
142. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

143. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-11.
144. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;40:1107-12.
145. Petnicki-Ocwieja T, Hrncir T, Liu YJ, et al. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15813-8.
146. Nighot PK, Hu CA, Ma TY. Autophagy enhances intestinal epithelial tight junction barrier function by targeting claudin-2 protein degradation. *J Biol Chem* 2015;290:7234-46.
147. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:653-60.
148. Rehman A, Sina C, Gavrilova O, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011;60:1354-62.
149. Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol* 2011;17:557-66.
150. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635-9.
151. Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617-23.
152. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305-9.
153. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202-9.
154. Garcia Vilela E, De Lourdes De Abreu Ferrari M, Oswaldo Da Gama Torres H, et al. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of

- patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:842-8.
155. Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, et al. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol* 2012;180:626-35.
 156. Camilleri M, Lasch K, Zhou W. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G775-85.
 157. Martinez C, Lobo B, Pigrau M, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut* 2013;62:1160-8.
 158. Piche T, Barbara G, Aubert P, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009;58:196-201.
 159. Barbara G, Cremon C, Carini G, et al. The immune system in irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil* 2011;17:349-59.
 160. Coeffier M, Gloro R, Boukhattala N, et al. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1181-8.
 161. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007;132:26-37.
 162. Buhner S, Li Q, Vignali S, et al. Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009;137:1425-34.
 163. Cremon C, Carini G, Wang B, et al. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1290-8.
 164. Brown PM, Drossman DA, Wood AJ, et al. The tryptophan hydroxylase inhibitor LX1031 shows clinical benefit in patients with nonconstipating irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:507-16.

165. Klooker TK, Braak B, Koopman KE, et al. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2010;59:1213-21.
166. Heizer WD, Southern S, McGovern S. The role of diet in symptoms of irritable bowel syndrome in adults: a narrative review. *J Am Diet Assoc* 2009;109:1204-14.
167. Clarke G, Cryan JF, Dinan TG, et al. Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome--focus on lactic acid bacteria. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:403-13.
168. Hoveyda N, Heneghan C, Mahtani KR, et al. A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol* 2009;9:15.
169. Schmulson M, Chang L. Review article: the treatment of functional abdominal bloating and distension. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1071-86.
170. Drossman DA, Hasler WL. Rome IV-Functional GI Disorders: Disorders of Gut-Brain Interaction. *Gastroenterology* 2016;150:1257-61.
171. Vanner S, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe G, et al. Fundamentals of Neurogastroenterology: Basic Science. *Gastroenterology* 2016.
172. RAE. Estrés. *Diccionario de la Lengua Española*. 23ª ed, 2014.
173. Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress* 2007;10:109-20.
174. Cannon W. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 1929;9:399-431.
175. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998;10:230-1.
176. Levine J. What is stress? In: Brown, ed. *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1991:3-21.
177. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 1993;153:2093-101.
178. Selye H. *Stress without distress*. New York: New American Library, 1974.

179. Goldstein DS. Concepts of scientific integrative medicine applied to the physiology and pathophysiology of catecholamine systems. *Compr Physiol* 2013;3:1569-610.
180. RAE. Resiliencia. *Diccionario de la Lengua Española*. 23ª ed, 2014.
181. De Palma G, Collins SM, Bercik P, et al. The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? *J Physiol* 2014;592:2989-97.
182. Cheng J, Palva AM, de Vos WM, et al. Contribution of the intestinal microbiota to human health: from birth to 100 years of age. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;358:323-46.
183. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:227-38.
184. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 2008;57:1605-15.
185. Jeffery IB, Claesson MJ, O'Toole PW, et al. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat Rev Microbiol* 2012;10:591-2.
186. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012;336:1262-7.
187. Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, et al. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 2009;325:617-20.
188. Backhed F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann Nutr Metab* 2011;58 Suppl 2:44-52.
189. Amaral FA, Sachs D, Costa VV, et al. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2193-7.
190. Wostmann BS. The germfree animal in nutritional studies. *Annu Rev Nutr* 1981;1:257-79.
191. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J* 2010;24:4948-59.

192. Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, et al. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol* 2007;56:1669-74.
193. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, et al. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* 2009;62:264-9.
194. De Palma G, Nadal I, Medina M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol* 2010;10:63.
195. Track NS. The gastrointestinal endocrine system. *Can Med Assoc J* 1980;122:287-92.
196. Collins SM, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology* 2009;136:2003-14.
197. Bercik P, Verdu EF, Foster JA, et al. Role of gut-brain axis in persistent abnormal feeding behavior in mice following eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:R587-94.
198. Victor DW, 3rd, Quigley EM. Hepatic encephalopathy involves interactions among the microbiota, gut, brain. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:1009-11.
199. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One* 2013;8:e76993.
200. Finegold SM, Downes J, Summanen PH. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe* 2012;18:260-2.
201. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008;320:1647-51.
202. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013;155:1451-63.
203. Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Begum-Haque S, et al. Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease. *Ann Neurol* 2011;69:240-7.

204. Caso JR, Leza JC, Menchen L. The effects of physical and psychological stress on the gastro-intestinal tract: lessons from animal models. *Curr Mol Med* 2008;8:299-312.
205. Anton PA, Shanahan F. Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel disease. How far from "bench" to "bedside"? *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:723-34.
206. Coss-Adame E, Rao SS. Brain and gut interactions in irritable bowel syndrome: new paradigms and new understandings. *Curr Gastroenterol Rep* 2014;16:379.
207. Ponferrada A. Mecanismos de disfunción de la barrera mucosa e inflamación en el colon de ratas tras exposición a estrés. Departamento de Farmacología. Volume PhD: Universidad Complutense de Madrid, 2006.
208. Rock JP, Oldfield EH, Schulte HM, et al. Corticotropin releasing factor administered into the ventricular CSF stimulates the pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 1984;323:365-8.
209. Lightman SL, Young WS, 3rd. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol* 1988;403:511-23.
210. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 1984;224:452-9.
211. Jones MT, Hillhouse EW, Burden JL. Structure-activity relationships of corticosteroid feedback at the hypothalamic level. *J Endocrinol* 1977;74:415-24.
212. Cole MA, Kim PJ, Kalman BA, et al. Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. *Psychoneuroendocrinology* 2000;25:151-67.
213. Chang YM, El-Zaatari M, Kao JY. Does stress induce bowel dysfunction? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;8:583-5.
214. Thompson WG. The irritable colon. *Can Med Assoc J* 1974;111:1236, 1241-4.
215. Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, et al. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for

- corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 2003;55:21-6.
216. Fekete EM, Zorrilla EP. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Front Neuroendocrinol* 2007;28:1-27.
 217. Kiank C, Tache Y, Larauche M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 2010;24:41-8.
 218. la Fleur SE, Wick EC, Idumalla PS, et al. Role of peripheral corticotropin-releasing factor and urocortin II in intestinal inflammation and motility in terminal ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:7647-52.
 219. Martinez V, Wang L, Rivier JE, et al. Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:611-7.
 220. Soderholm JD, Perdue MH. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G7-G13.
 221. Rodino-Janeiro BK, Alonso-Cotoner C, Pigrau M, et al. Role of Corticotropin-releasing Factor in Gastrointestinal Permeability. *J Neurogastroenterol Motil* 2015;21:33-50.
 222. Chatzaki E, Crowe PD, Wang L, et al. CRF receptor type 1 and 2 expression and anatomical distribution in the rat colon. *J Neurochem* 2004;90:309-16.
 223. Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, et al. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* 1996;271:G884-92.
 224. Castagliuolo I, Wershil BK, Karalis K, et al. Colonic mucin release in response to immobilization stress is mast cell dependent. *Am J Physiol* 1998;274:G1094-1100.
 225. Soderholm JD, Yang PC, Ceponis P, et al. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 2002;123:1099-108.

226. Hirata T, Keto Y, Nakata M, et al. Effects of serotonin 5-HT₃ receptor antagonists on stress-induced colonic hyperalgesia and diarrhoea in rats: a comparative study with opioid receptor agonists, a muscarinic receptor antagonist and a synthetic polymer. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:557-65.
227. Saunders PR, Maillot C, Million M, et al. Peripheral corticotropin-releasing factor induces diarrhea in rats: role of CRF1 receptor in fecal watery excretion. *Eur J Pharmacol* 2002;435:231-5.
228. Barclay GR, Turnberg LA. Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology* 1987;93:91-7.
229. Barclay GR, Turnberg LA. Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology* 1988;94:994-8.
230. Saunders PR, Kosecka U, McKay DM, et al. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol* 1994;267:G794-9.
231. Cameron HL, Perdue MH. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:214-20.
232. Bijlsma PB, van Raaij MT, Dobbe CJ, et al. Subchronic mild noise stress increases HRP permeability in rat small intestine in vitro. *Physiol Behav* 2001;73:43-9.
233. Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, et al. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 2006;55:655-61.
234. Saunders PR, Hanssen NP, Perdue MH. Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol* 1997;273:G486-90.
235. Kuge T, Greenwood-Van Meerveld B, Sokabe M. Stress-induced breakdown of intestinal barrier function in the rat: reversal by wood creosote. *Life Sci* 2006;79:913-8.
236. Ponferrada A, Caso JR, Alou L, et al. The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* 2007;132:1791-803.

237. Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* 1998;275:G1037-44.
238. Liu S, Ren W, Qu MH, et al. Differential actions of urocortins on neurons of the myenteric division of the enteric nervous system in guinea pig distal colon. *Br J Pharmacol* 2010;159:222-36.
239. Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, et al. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 2003;125:795-804.
240. Weber CR, Raleigh DR, Su L, et al. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem* 2010;285:12037-46.
241. Santos J, Perdue MH. Stress and neuroimmune regulation of gut mucosal function. *Gut* 2000;47 Suppl 4:iv49-51; discussion iv52.
242. Buhner S, Schemann M. Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:85-92.
243. Kempuraj D, Papadopoulou NG, Lytinas M, et al. Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology* 2004;145:43-8.
244. Santos J, Yates D, Guilarte M, et al. Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:1248-56.
245. Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, et al. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol* 1999;277:G391-9.
246. Smith F, Clark JE, Overman BL, et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G352-63.
247. Wallon C, Persborn M, Jonsson M, et al. Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;140:1597-607.
248. Chadwick VS, Chen W, Shu D, et al. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002;122:1778-83.

249. Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H, et al. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 2014;63:1293-9.
250. Sun Y, Zhang M, Chen CC, et al. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. *Gastroenterology* 2013;144:1478-87, 1487 e1-8.
251. Park AJ, Collins J, Blennerhassett PA, et al. Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:733-e575.
252. Xu D, Gao J, Gilliland M, 3rd, et al. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology* 2014;146:484-96 e4.
253. Ait-Belgnaoui A, Han W, Lamine F, et al. *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. *Gut* 2006;55:1090-4.
254. Eutamene H, Lamine F, Chabo C, et al. Synergy between *Lactobacillus paracasei* and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats. *J Nutr* 2007;137:1901-7.
255. Holdeman LV, Good IJ, Moore WE. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 1976;31:359-75.
256. Knowles SR, Nelson EA, Palombo EA. Investigating the role of perceived stress on bacterial flora activity and salivary cortisol secretion: a possible mechanism underlying susceptibility to illness. *Biol Psychol* 2008;77:132-7.
257. Noor SO, Ridgway K, Scovell L, et al. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC Gastroenterol* 2010;10:134.
258. Pimentel M, Lembo A, Chey WD, et al. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 2011;364:22-32.
259. Marquez L, Abanades S, Andreu M. [Endocannabinoid system and bowel inflammation]. *Med Clin (Barc)* 2008;131:513-7.

260. Adams R. Marihuana: Harvey Lecture, February 19, 1942. *Bull N Y Acad Med* 1942;18:705-30.
261. Mechoulam R, Gaoni Y. Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr Chem Org Naturst* 1967;25:175-213.
262. ElSohly M. Chemical constituents of cannabis. In: Grotenhermen F RE, ed. *Cannabis and Cannabinoids Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*. New York: Haworth Press, 2002:27-36.
263. Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. In: Izzo AA, ed. *Cannabinoids, Handbook of experimental pharmacology*. Volume 168. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005:1-52.
264. Mechoulam R, Gaoni Y. A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 1965;87:3273-5.
265. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev* 2010;62:588-631.
266. Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988;34:605-13.
267. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-4.
268. Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, et al. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 1991;279 (Pt 1):129-34.
269. Valenti M, Cottone E, Martinez R, et al. The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *J Neurochem* 2005;95:662-72.
270. Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:619-31.
271. Izzo AA, Camilleri M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut* 2008;57:1140-55.

272. Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, et al. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58:322-8.
273. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-5.
274. Galiegue S, Mary S, Marchand J, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995;232:54-61.
275. Duncan M, Mouihate A, Mackie K, et al. Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G78-G87.
276. Wright KL, Duncan M, Sharkey KA. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol* 2008;153:263-70.
277. Katchan V, David P, Shoenfeld Y. Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review. *Autoimmun Rev* 2016;15:513-28.
278. Pertwee RG. Endocannabinoids and their pharmacological action. In: Pertwee RG, ed. *Endocannabinoids, handbook of Experimental Pharmacology*. Switzerland: Springer International Publishing, 2015.
279. Izzo AA, Camilleri M. Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. *Pharmacol Res* 2009;60:117-25.
280. Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D. The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol* 2008;154:369-83.
281. Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006;58:389-462.
282. Capasso R, Matias I, Lutz B, et al. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 2005;129:941-51.
283. Duncan M, Thomas AD, Cluny NL, et al. Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1255-65.
284. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:438-55.

285. Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007;152:567-75.
286. Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther* 2010;126:21-38.
287. Aviello G, Romano B, Izzo AA. Cannabinoids and gastrointestinal motility: animal and human studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008;12 Suppl 1:81-93.
288. Alhouayek M, Lambert DM, Delzenne NM, et al. Increasing endogenous 2-arachidonoylglycerol levels counteracts colitis and related systemic inflammation. *FASEB J* 2011;25:2711-21.
289. Grider JR, Mahavadi S, Li Y, et al. Modulation of motor and sensory pathways of the peristaltic reflex by cannabinoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G539-49.
290. Ameloot K, Janssen P, Scarpellini E, et al. Endocannabinoid control of gastric sensorimotor function in man. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:1123-31.
291. Esfandyari T, Camilleri M, Ferber I, et al. Effect of a cannabinoid agonist on gastrointestinal transit and postprandial satiation in healthy human subjects: a randomized, placebo-controlled study. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:831-8.
292. Esfandyari T, Camilleri M, Busciglio I, et al. Effects of a cannabinoid receptor agonist on colonic motor and sensory functions in humans: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G137-45.
293. Baldassano S, Zizzo MG, Serio R, et al. Interaction between cannabinoid CB1 receptors and endogenous ATP in the control of spontaneous mechanical activity in mouse ileum. *Br J Pharmacol* 2009;158:243-51.
294. Hons IM, Storr MA, Mackie K, et al. Plasticity of mouse enteric synapses mediated through endocannabinoid and purinergic signaling. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:e113-24.
295. Sibaev A, Massa F, Yuce B, et al. CB1 and TRPV1 receptors mediate protective effects on colonic electrophysiological properties in mice. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:513-20.

296. Izzo AA, Fezza F, Capasso R, et al. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 2001;134:563-70.
297. Wong BS, Camilleri M, Busciglio I, et al. Pharmacogenetic trial of a cannabinoid agonist shows reduced fasting colonic motility in patients with nonconstipated irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:1638-47 e1-7.
298. Izzo AA, Muccioli GG, Ruggieri MR, et al. Endocannabinoids and the Digestive Tract and Bladder in Health and Disease. *Handb Exp Pharmacol* 2015;231:423-47.
299. Sanson M, Bueno L, Fioramonti J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:949-56.
300. Klooker TK, Leliefeld KE, Van Den Wijngaard RM, et al. The cannabinoid receptor agonist delta-9-tetrahydrocannabinol does not affect visceral sensitivity to rectal distension in healthy volunteers and IBS patients. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:30-5, e2.
301. Besnard P, Passilly-Degrace P, Khan NA. Taste of Fat: A Sixth Taste Modality? *Physiol Rev* 2016;96:151-76.
302. Running CA, Craig BA, Mattes RD. Oleogustus: The Unique Taste of Fat. *Chem Senses* 2015;40:507-16.
303. DiPatrizio NV, Piomelli D. The thrifty lipids: endocannabinoids and the neural control of energy conservation. *Trends Neurosci* 2012;35:403-11.
304. DiPatrizio NV, Piomelli D. Intestinal lipid-derived signals that sense dietary fat. *J Clin Invest* 2015;125:891-8.
305. DiPatrizio NV, Astarita G, Schwartz G, et al. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12904-8.
306. DiPatrizio NV, Joslin A, Jung KM, et al. Endocannabinoid signaling in the gut mediates preference for dietary unsaturated fats. *FASEB J* 2013;27:2513-20.
307. DiPatrizio NV, Igarashi M, Narayanaswami V, et al. Fasting stimulates 2-AG biosynthesis in the small intestine: role of cholinergic pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015;309:R805-13.

308. Pradhan SN, Roth T. Comparative behavioral effects of several anticholinergic agents in rats. *Psychopharmacologia* 1968;12:358-66.
309. Lorenz D, Nardi P, Smith GP. Atropine methyl nitrate inhibits sham feeding in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1978;8:405-7.
310. Sykaras AG, Demenis C, Case RM, et al. Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors. *PLoS One* 2012;7:e42373.
311. Tyler K, Hillard CJ, Greenwood-Van Meerveld B. Inhibition of small intestinal secretion by cannabinoids is CB1 receptor-mediated in rats. *Eur J Pharmacol* 2000;409:207-11.
312. MacNaughton WK, Van Sickle MD, Keenan CM, et al. Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G863-71.
313. Izzo AA, Capasso F, Costagliola A, et al. An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice. *Gastroenterology* 2003;125:765-74.
314. DiPatrizio NV. Endocannabinoids in the Gut. *Cannabis Cannabinoid Res* 2016;1:67-77.
315. Parker LA, Rock EM, Limebeer CL. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids. *Br J Pharmacol* 2011;163:1411-22.
316. Sharkey KA, Darmani NA, Parker LA. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids and the endocannabinoid system. *Eur J Pharmacol* 2014;722:134-46.
317. Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, et al. Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology* 2001;121:767-74.
318. Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 2005:299-325.
319. Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005;310:329-32.

320. Smith LA, Azariah F, Lavender VT, et al. Cannabinoids for nausea and vomiting in adults with cancer receiving chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2015:CD009464.
321. Galli JA, Sawaya RA, Friedenbergr FK. Cannabinoid hyperemesis syndrome. *Curr Drug Abuse Rev* 2011;4:241-9.
322. Darmani NA. Cannabinoid-Induced Hyperemesis: A Conundrum-From Clinical Recognition to Basic Science Mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010;3:2163-2177.
323. Cani PD, Plovier H, Van Hul M, et al. Endocannabinoids--at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12:133-43.
324. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med* 2007;13:35-7.
325. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994;8:217-25.
326. Muccioli GG, Naslain D, Backhed F, et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol* 2010;6:392.
327. Kimball ES, Schneider CR, Wallace NH, et al. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G364-71.
328. Storr MA, Keenan CM, Zhang H, et al. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1678-85.
329. Storr MA, Keenan CM, Emmerdinger D, et al. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:925-36.
330. Strisciuglio C, Bellini G, Miele E, et al. Cannabinoid Receptor 2 Functional Variant Contributes to the Risk for Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol* 2016.

331. Marquez L, Suarez J, Iglesias M, et al. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS One* 2009;4:e6893.
332. Naftali T, Bar-Lev Schleider L, Dotan I, et al. Cannabis induces a clinical response in patients with Crohn's disease: a prospective placebo-controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:1276-1280 e1.
333. Irving PI, T; Nwokolo, C; Subramanian, S; Bloom, S; Prasad, N; Hart, A. P414: Cannabidiol for symptomatic treatment of ulcerative colitis: Results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel group, multi-centred pilot study. *Journal of Crohn's and Colitis* 2015;9:S287.
334. Lal S, Prasad N, Ryan M, et al. Cannabis use amongst patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:891-6.
335. Naftali T, Mechulam R, Lev LB, et al. Cannabis for inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2014;32:468-74.
336. Baker D, Pryce G, Giovannoni G, et al. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2003;2:291-8.
337. Lahat A, Lang A, Ben-Horin S. Impact of cannabis treatment on the quality of life, weight and clinical disease activity in inflammatory bowel disease patients: a pilot prospective study. *Digestion* 2012;85:1-8.
338. Garcia-Planella E, Marin L, Domenech E, et al. [Use of complementary and alternative medicine and drug abuse in patients with inflammatory bowel disease]. *Med Clin (Barc)* 2007;128:45-8.
339. Alhamoruni A, Wright KL, Larvin M, et al. Cannabinoids mediate opposing effects on inflammation-induced intestinal permeability. *Br J Pharmacol* 2012;165:2598-610.
340. Alhamoruni A, Lee AC, Wright KL, et al. Pharmacological effects of cannabinoids on the Caco-2 cell culture model of intestinal permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335:92-102.
341. Harvey BS, Nicotra LL, Vu M, et al. Cannabinoid CB2 receptor activation attenuates cytokine-evoked mucosal damage in a human colonic explant model without changing epithelial permeability. *Cytokine* 2013;63:209-17.

342. Colon AL, Madrigal JL, Menchen LA, et al. Stress increases susceptibility to oxidative/nitrosative mucosal damage in an experimental model of colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2004;49:1713-21.
343. Ledent C, Valverde O, Cossu G, et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999;283:401-4.
344. Kiank C, Holtfreter B, Starke A, et al. Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun* 2006;20:359-68.
345. Zoppi S, Madrigal JL, Caso JR, et al. Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. *Br J Pharmacol* 2014;171:2814-26.
346. Zoppi S, Perez Nieves BG, Madrigal JL, et al. Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 2011;36:805-18.
347. Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R, et al. Experimental models of stress and wound healing. *World J Surg* 2004;28:327-30.
348. Poland RE, Cloak C, Lutchmansingh PJ, et al. Brain N-acetyl aspartate concentrations measured by H MRS are reduced in adult male rats subjected to perinatal stress: preliminary observations and hypothetical implications for neurodevelopmental disorders. *J Psychiatr Res* 1999;33:41-51.
349. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 2000;886:172-189.
350. Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, et al. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 1999;5:1178-82.
351. Li S, Wang C, Wang W, et al. Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci* 2008;82:934-42.
352. Ogawa H, Iimura M, Eckmann L, et al. Regulated production of the chemokine CCL28 in human colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1062-9.

353. Rotllant D, Ons S, Carrasco J, et al. Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary-adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. *Eur J Neurosci* 2002;16:693-700.
354. Bernstein CN, Singh S, Graff LA, et al. A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1994-2002.
355. Langhorst J, Hofstetter A, Wolfe F, et al. Short-term stress, but not mucosal healing nor depression was predictive for the risk of relapse in patients with ulcerative colitis: a prospective 12-month follow-up study. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:2380-6.
356. Pare WP. Prior stress and susceptibility to stress ulcer. *Physiol Behav* 1986;36:1155-9.
357. Barreau F, Cartier C, Leveque M, et al. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol* 2007;580:347-56.
358. Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today* 2010;15:474-83.
359. Leinwand KL, Gerich ME, Hoffenberg EJ, et al. Manipulation of the Endocannabinoid System in Colitis: A Comprehensive Review. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23:192-199.
360. Di Sabatino A, Battista N, Biancheri P, et al. The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 2011;4:574-83.
361. Salaga M, Mokrowiecka A, Zakrzewski PK, et al. Experimental colitis in mice is attenuated by changes in the levels of endocannabinoid metabolites induced by selective inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH). *J Crohns Colitis* 2014;8:998-1009.
362. Vendel E, de Lange EC. Functions of the CB1 and CB 2 receptors in neuroprotection at the level of the blood-brain barrier. *Neuromolecular Med* 2014;16:620-42.

363. El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, et al. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol* 2006;168:235-44.
364. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, et al. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H610-9.
365. Lu TS, Avraham HK, Seng S, et al. Cannabinoids inhibit HIV-1 Gp120-mediated insults in brain microvascular endothelial cells. *J Immunol* 2008;181:6406-16.
366. Feinshtein V, Erez O, Ben-Zvi Z, et al. Cannabidiol enhances xenobiotic permeability through the human placental barrier by direct inhibition of breast cancer resistance protein: an ex vivo study. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209:573 e1-573 e15.
367. Volynets V, Reichold A, Bardos G, et al. Assessment of the Intestinal Barrier with Five Different Permeability Tests in Healthy C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Dig Dis Sci* 2016;61:737-46.
368. Zimmer A. Genetic Manipulation of the Endocannabinoid System. *Handb Exp Pharmacol* 2015;231:129-83.
369. Maxton DG, Bjarnason I, Reynolds AP, et al. Lactulose, 51Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate, L-rhamnose and polyethyleneglycol 400 [corrected] as probe markers for assessment in vivo of human intestinal permeability. *Clin Sci (Lond)* 1986;71:71-80.
370. Meddings JB, Gibbons I. Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat. *Gastroenterology* 1998;114:83-92.
371. Banan A, Farhadi A, Fields JZ, et al. The delta-isoform of protein kinase C causes inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide up-regulation: key mechanism for oxidant-induced carbonylation, nitration, and disassembly of the microtubule cytoskeleton and hyperpermeability of barrier of intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:482-94.
372. Han X, Fink MP, Yang R, et al. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 2004;21:261-70.

373. Jeon YJ, Yang KH, Pulaski JT, et al. Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor- kappa B/Rel activation. *Mol Pharmacol* 1996;50:334-41.
374. Esposito G, Izzo AA, Di Rosa M, et al. Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *J Neurochem* 2001;78:835-41.
375. Dheer R, Santaolalla R, Davies JM, et al. Intestinal Epithelial Toll-Like Receptor 4 Signaling Affects Epithelial Function and Colonic Microbiota and Promotes a Risk for Transmissible Colitis. *Infect Immun* 2016;84:798-810.
376. Fukata M, Michelsen KS, Eri R, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1055-65.
377. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
378. Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 2005;206:64-82.
379. Schlosburg JE, O'Neal ST, Conrad DH, et al. CB1 receptors mediate rimonabant-induced pruritic responses in mice: investigation of locus of action. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;216:323-31.
380. Hieshima K, Kawasaki Y, Hanamoto H, et al. CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J Immunol* 2004;173:3668-75.
381. Bertin B, Dubuquoy L, Colombel JF, et al. PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Curr Drug Targets* 2013;14:1501-7.
382. Ambrosio AL, Dias SM, Polikarpov I, et al. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2007;282:18625-33.
383. O'Sullivan SE, Tarling EJ, Bennett AJ, et al. Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome

- proliferator-activated receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:824-31.
384. Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res* 2007;2007:23513.
385. Lepicier P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, et al. Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *J Pharmacol Sci* 2006;102:155-66.
386. Burns KA, Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:952-60.
387. Barna I, Zelena D, Arszovszki AC, et al. The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci* 2004;75:2959-70.
388. Zheng G, Wu SP, Hu Y, et al. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:e127-39.
389. Conte-Devolx B, Guillaume V, Boudouresque F, et al. Effects of metyrapone infusion on corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;127:435-40.
390. Kupferschmidt DA, Klas PG, Erb S. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of corticotropin-releasing factor on the reinstatement of cocaine seeking and expression of cocaine-induced behavioural sensitization. *Br J Pharmacol* 2012;167:196-206.
391. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:3-20; quiz 21-2.
392. Collins SM. Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G315-8.
393. Fioramonti J, Gebhart GF. In vivo and transgenic animal models used to study visceral hypersensitivity. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:20-8.
394. Hornby PJ, Prouty SM. Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception. *Br J Pharmacol* 2004;141:1335-45.

- 395. Storr MA, Yuce B, Andrews CN, et al. The role of the endocannabinoid system in the pathophysiology and treatment of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:857-68.
- 396. Kerbrat A, Ferre JC, Fillatre P, et al. Acute Neurologic Disorder from an Inhibitor of Fatty Acid Amide Hydrolase. *N Engl J Med* 2016;375:1717-1725.
- 397. Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, et al. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 2002;123:227-34.
- 398. Abalo R, Chen C, Vera G, et al. In vitro and non-invasive in vivo effects of the cannabinoid-1 receptor agonist AM841 on gastrointestinal motor function in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2015;27:1721-35.
- 399. Keenan CM, Storr MA, Thakur GA, et al. AM841, a covalent cannabinoid ligand, powerfully slows gastrointestinal motility in normal and stressed mice in a peripherally restricted manner. *Br J Pharmacol* 2015;172:2406-18.
- 400. Mathison R, Ho W, Pittman QJ, et al. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol* 2004;142:1247-54.
- 401. Izzo AA, Pinto L, Borrelli F, et al. Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological states or during the diarrhoea induced by croton oil. *Br J Pharmacol* 2000;129:1627-32.

